

# **VERSTÄRKUNG DER TRANSLATION STROMAUFWÄRTS GELEGENER REPORTERGENE DURCH INTERNE RIBOSOMEN-EINTRITTSSTELLEN VON PICORNAVIREN**

**Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
im Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von Christiane Jünemann, Diplom-Biologin

Erstgutachterin:	Prof. Dr. T. Trenczek Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie Fachbereich Biologie und Chemie
Zweitgutachter:	HD Dr. M. Niepmann Biochemisches Institut Fachbereich Humanmedizin

Gießen, im Juni 2007

## **Verstärkung der Translation stromaufwärts gelegener Reportergene durch interne Ribosomen-Eintrittsstellen von Picornaviren**

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass die internen Ribosomen-Eintrittsstellen (IRES) von Picornaviren die Translation nicht nur des stromabwärts gelegenen Gens fördern, sondern auch die Translation eines stromaufwärts der IRES gelegenen Gens verstärken können. Die Kenntnis dieses Effektes hat Auswirkungen auf die Interpretation der Ergebnisse von Replikations- und Translationsstudien mit dicistronischen Replikonsystemen und das Design viraler Replikonsysteme.

Die meisten zellulären mRNAs werden cap-abhängig translatiert. Dabei bindet der aus den eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF4E, eIF4G und eIF4A bestehende Cap-Bindungs-Komplex eIF4F an das Cap-Nukleotid am 5'-Ende der mRNA und bewirkt zusammen mit anderen Initiationsfaktoren die Bindung der kleinen ribosomalen Untereinheit an die mRNA. Bei einigen viralen und zellulären RNAs erfolgt dieser Vorgang dagegen Cap-unabhängig an einer internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES). Die IRES-Elemente der Picornaviren benötigen dafür alle eukaryotischen Initiationsfaktoren außer dem Cap-bindenden Protein eIF4E. Andere IRES-Elemente, wie das von Hepatitis C Virus (HCV), benötigen dafür außer eIF3 keine weiteren Initiationsfaktoren.

Picornavirale IRES-Elemente werden vor allem in viralen Replikonsystemen, aber auch in dicistronischen (oder multicistronischen) Vektoren in der Gentherapie oder zur Analyse der Funktion der IRES-Elemente selbst verwendet. In solchen Vektoren wird oft die Expression des ersten, vor der IRES gelegenen Reportergens als interne Kontrolle verwendet, mit deren Hilfe die Expression des zur Messung der IRES-Aktivität verwendeten zweiten, stromabwärts der IRES gelegenen Reportergens standardisiert wird.

Während Reportergene in dicistronischen Vektoren mit einer Picornavirus-IRES bis zu einer Salzkonzentration von 120 mM K<sup>+</sup> optimal translatiert werden, werden Gene in einer monocistronischen mRNA meist nur bei Salzkonzentrationen bis etwa 90 mM K<sup>+</sup> optimal translatiert. Werden diese Gene allerdings in einem dicistronischen Konstrukt vor einer Picornavirus-IRES eingefügt, werden auch sie bei höheren K<sup>+</sup>-Konzentrationen bis etwa 120 mM effizient translatiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Verstärkung der Translation unabhängig von der Natur des ersten Reportergens und von der Translation des zweiten, stromabwärts gelegenen Reportergens ist. Dieser Verstärkungseffekt erfolgt in *cis* und er tritt nicht bei Verwendung einer HCV-IRES auf. Bei Verwendung einer mutierten Picornavirus-IRES, die zwar noch die Bindungsstelle für eIF4G, aber keine IRES-Aktivität mehr aufweist, wird die Translation des stromaufwärts gelegenen Reporters noch effizient verstärkt. Der Effekt der Translations-Verstärkung wird durch kompetierendes Cap-Nukleotid gehemmt, was zeigt, dass eIF4F der entscheidend an diesem Vorgang beteiligte Faktor ist. Auch nachdem eIF4G mittels einer picornaviralen Protease gespalten wurde, konnte der erste Reporter noch effizient translatiert werden, das C-terminale Fragment von eIF4G ist also für die Verstärkung der Translation des ersten Reporters ausreichend.

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass der eIF4F-Komplex, der an ein picornavirales IRES-Element in einer dicistronischen RNA über das eIF4G-Protein gebunden hat, in *cis* an das 5'-Ende der RNA weitergereicht werden kann, wo er entweder durch eIF4E an das Cap-Nukleotid oder wiederum über eIF4G an die RNA bindet und dann die Translation stimuliert.

**Picornavirus IRES elements can enhance translation of upstream genes**

The internal ribosome entry site (IRES) elements of picornaviruses not only drive the translation of downstream reportergens but also may stimulate the translation of a gene placed upstream of the IRES. This knowledge is important for the interpretation of results obtained with such dicistronic constructs and for the design of viral replicons.

Most mRNAs are translated in a cap-dependent manner. The initiation factor complex eIF4F, consisting of the eukaryotic initiation factors eIF4E, eIF4G and eIF4A, binds to the cap nucleotide at the 5'-end of the mRNA. Together with other eukaryotic initiation factors this interaction guides the small ribosomal subunit to the 5'-end of the mRNA. The resulting pre-initiation complex then scans the mRNA for the start codon. Once the start codon is reached, the large ribosomal subunit binds and translation commences.

Certain viral and cellular RNAs initiate translation cap-independently at IRES elements. To initiate translation, picornavirus IRES elements require all canonical eukaryotic initiation factors (except the cap-binding protein eIF4E). Other viral IRES elements like the Hepatitis C virus (HCV) IRES can bind to the small ribosomal subunit in the absence of virtually all translation initiation factors except for eIF3.

Picornaviral IRES elements are used in viral replicon systems and dicistronic (or multicistronic) vectors, in gene therapy or to investigate the activity of a given IRES element and its mutant variants. When using such dicistronic constructs, the translation efficiency of the second reporter gene located downstream of the IRES serves as a measure for the activity of the IRES element, whereas the translation of the first reporter gene is usually used for normalization.

While reporter genes in dicistronic constructs are well translated at salt concentrations up to 120 mM K<sup>+</sup>, reporter genes in a monocistronic mRNA are translated well only at salt concentrations up to 90 mM K<sup>+</sup>. When placed in a dicistronic construct upstream of an IRES element, these reporter genes are translated efficiently at K<sup>+</sup> concentrations up to 120 mM.

In this study it is shown that internal ribosome entry sites can enhance translation not only of the downstream gene but also of a gene upstream of the IRES at salt concentrations that are comparable to those in living cells. This translation enhancement is independent of the nature of the first reporter and independent of the translation of the second reporter. This effect occurs in *cis* and was not observed when using the HCV IRES. A mutant picornaviral IRES element still able to bind eIF4G can stimulate the translation of the first reporter gene, and translation of this first reporter still occurs efficiently when eIF4G is cleaved with a picornaviral protease. By using m<sup>7</sup>GDP, which inhibits binding of the cap-binding eIF4E moiety of translation initiation factor eIF4F to the 5'-terminal cap nucleotide of mRNAs, eIF4F was shown to mediate the translation enhancement.

From these findings it is concluded that the eIF4F complex bound to a picornaviral IRES element via its eIF4G moiety can be delivered in *cis* to the 5'-end of the RNA. eIF4F can then bind to the 5'-terminal end of the RNA either by its cap-binding protein eIF4E to the cap nucleotide or by the intrinsic RNA-binding site of eIF4G and stimulate translation.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Abstract

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Picornaviren	2
1.1.1	Struktur und Genomorganisation	3
1.1.2	Infektionszyklus	4
1.2	Mechanismen der Translation	5
1.2.1	Cap-abhängige Initiation der Translation	6
1.2.2	Initiation der Translation durch eine picornavirale interne Ribosomen-Eintrittsstelle	10
1.3	Ziele dieser Arbeit	12
<b>2.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>13</b>
2.1	Eine Picornavirus-IRES in dicistronischen Konstrukten kann unter physiologischen Salzkonzentrationen die Translation des ersten Reportergens verstärken	13
2.2	Die Verstärkung der Expression des ersten Reporters ist unabhängig vom Typ der verwendeten picornaviralen IRES	15
2.3	Die Verstärkung der Expression des ersten Reporters ist unabhängig von der Art des verwendeten ersten Reportergens	16
2.4	Die Stimulation der Translation des ersten Reporters erfolgt in <i>cis</i>	19
2.5	Die Stimulation der Translation des ersten Reporters korreliert mit der Funktionalität der IRES	19
2.6	Stimulation der Translation <i>in vivo</i>	23
	Exkurs: Schwierigkeiten bei der Messung der Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase	25
2.7	Die Translation des zweiten Reporters ist für die Verstärkung der Translation durch ein IRES-Element nicht notwendig	26
2.8	Eine HCV-IRES im dicistronischen Kontext kann keine Verstärkung der Translation des ersten Reporters bewirken	28
2.9	Die Fähigkeit einer Picornavirus-IRES, die Translation des ersten Reporters zu verstärken, wird durch ihre Fähigkeit zur Bindung von eIF4F determiniert	30
2.10	Hippuristanol inhibiert die Translation bei eIF4F-abhängigen IRES-Elementen vollständig	31
2.11	eIF4F verstärkt die Translation des ersten Reporters in dicistronischen Konstrukten mit einer Picornavirus-IRES	33
2.12	Das C-terminale Ende von eIF4G ist für die Stimulation der Translation des ersten Reporters ausreichend	35

<b>3.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>37</b>
3.1	Der eukaryotische Initiationskomplex eIF4F	37
3.2	Eine Picornavirus-IRES kann eIF4F in <i>cis</i> an das 5'-Ende der RNA liefern	39
3.3	Auswirkungen für das Design von polycistronischen Reporterkonstrukten und Replikonsystemen	41
3.4	Fazit	44
<b>4.</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>46</b>
4.1	Mikrobiologische Methoden	46
4.1.1	Bakterienstamm	46
4.1.2	Nährböden und Flüssigmedien	46
4.1.3	Antibiotika	46
4.1.4	Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen (Kalziumchlorid-Methode)	46
4.1.5	Transformation von Plasmid-DNA oder Ligationsansätzen in kompetente Bakterienzellen	47
4.2	Molekularbiologische Methoden	47
4.2.1	Klonierungen	47
4.2.1.1	Dicistronische Konstrukte mit einer FMDV-IRES	47
4.2.1.2	Dicistronische Konstrukte mit einer PV-IRES	48
4.2.2	Präparation von Plasmid-DNA	48
4.2.2.1	Minipräparation mit "GFX Micro Plasmid Prep Kit" (Amersham Biosciences)	49
4.2.2.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA mit "NucleoBond AX 100" (Macherey-Nagel)	49
4.2.3	Modifikation von Plasmid-DNA	50
4.2.3.1	Restriktionsverdau	50
4.2.3.2	Ligation	50
4.2.3.3	Dephosphorylierung von 5'-Enden	50
4.2.3.4	Auffüllen von 5'-Überhängen mit DNA Polymerase I (Klenow-Fragment)	50
4.2.3.5	Glätten von 3'-Überhängen durch T4 DNA Polymerase	51
4.2.4	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	51
4.2.4.1	Proteinase K-Verdau	51
4.2.4.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	51
4.2.4.3	Alkoholfällung	51
4.2.4.4	Fällung von RNA mit Ammoniumacetat	51
4.2.5	RNA-Synthese <i>in vitro</i>	52
4.2.5.1	<i>In vitro</i> -Transkription	52
4.2.5.2	<i>In vitro</i> -Transkription mit Cap-Nukleotid und Poly(A)-Schwanz	52
4.2.6	Gel-Elektrophorese von Nukleinsäuren	52
4.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	53
4.3	Proteinbiochemie	53
4.3.1	<i>In vitro</i> -Translation	53

4.3.1.1	<i>In vitro</i> -Translation in Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL)	53
4.3.1.2	<i>In vitro</i> -Translation in HeLa-Zellextrakt	54
4.3.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	54
4.3.3	Western Blot	54
4.3.4	Autoradiographie	54
4.3.5	Nachweis der Expression von Reportergenen	55
4.3.5.1	Präparation von Zellextrakten zur Messung der Reportergen-Expression	55
4.3.5.2	Nachweis der Expression von Firefly Luziferase (Fluc)	55
4.3.5.3	Nachweis von <i>Renilla</i> Luziferase (Rluc)	56
4.3.5.4	Nachweis von beta-Galactosidase (beta-Gal)	56
4.3.5.5	Nachweis von Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)	56
4.4	Zellkultur	57
4.4.1	Verwendete eukaryotische Zellen	57
4.4.2	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	57
4.4.3	Transfektion von RNA	57
4.4.4	Extraktion cytoplasmatischer RNA aus eukaryotischen Zellen	57
4.5	Lösungen für die Molekularbiologie und die Proteinbiochemie	58
4.6	Verzeichnis der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien	59
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>66</b>
	Plasmidkarten	66
	Sequenzen der in dieser Arbeit benutzten Oligonukleotide	70
	Originalmessdaten Rluc-Expression in RRL und HeLa-Extrakt (zu Abb. 2.20)	71
	Abkürzungen	76
	Verzeichnis der Abbildungen	78
	Verzeichnis der Tabellen	80
	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	81
	Danksagung	82
	Eidesstattliche Erklärung	83

## 1. Einleitung

Viren sind kleine Partikel, die aus Proteinen und einer Erbinformation in Form von DNA oder RNA bestehen. Sie haben keinen eigenständigen Stoffwechsel und sind für ihre Vermehrung auf lebende Zellen angewiesen. Außerhalb ihrer Wirtszellen können viele Viren über Jahre in einem inaktiven Zustand überleben. Ist ein Virus in eine Zelle gelangt, so benutzt es die Wirtszelle, um neue infektiöse Partikel synthetisieren zu lassen. Viren befallen Bakterien, Pflanzen, Tiere und Menschen und können dort sowohl harmlose Krankheiten wie eine Erkältung (Rhinoviren) als auch tödliche Erkrankungen wie hämorrhagisches Fieber (Ebola Virus) auslösen.

Viren werden nach der Art ihrer Erbinformation klassifiziert, wobei zwischen doppel- oder einzelsträngiger DNA beziehungsweise RNA unterschieden wird. Einzelsträngige RNA (single-stranded RNA, ssRNA) kann sowohl in "positiver" (5'-3'-Richtung) als auch "negativer" Orientierung (3'-5'-Richtung) des Leserasters vorliegen. Die Erbinformation von ssRNA-Viren mit positiver Ausrichtung des Genoms kann nach Eintritt in die Wirtszelle sofort translatiert werden, während alle anderen Viren ihr Genom nach Eintritt in die Zelle zuerst in einzelsträngige, positiv orientierte RNA umschreiben (lassen) müssen. Neben der Art der Nukleinsäure wird auch die Symmetrie des Kapsids zur Klassifikation herangezogen. Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Taxonomie von Viren ist das Fehlen oder Vorhandensein einer Hülle, des sogenannten "Envelopes". Diese Hülle besteht aus Lipiden aus der Membran der Wirtszelle und viralen Kapsidproteinen und entsteht durch das Knospen ("budding") der Viruspartikel (Virione). Viren, die diese Hüllmembran nicht besitzen, werden als "nackt" bezeichnet (Chazal & Gerlier, 2003, Flint et al., 2004).

Als erstes Virus überhaupt wurde 1882 von Adolf Mayer das phytopathogene Tabakmosaik-Virus entdeckt, allerdings hielt Mayer den Erreger dieser Krankheit bei Tabakpflanzen für ein kleines Bakterium, dass die zu dieser Zeit zum Entfernen von Bakterien aus Extrakten verwendeten Chamberland-Filter passieren konnte. 1898 wurde auch von Martinus Beijerinck die Beobachtung gemacht, dass der Erreger der Tabakmosaik-Krankheit im Filtrat zu finden war und er bezeichnete ihn als "lebende, ansteckende Flüssigkeit" (*contagium vivum fluidum*) und charakterisierte so seine Fähigkeit zu Infektion und Replikation. Um diese kleinen, nicht-bakteriellen Krankheitserreger zu beschreiben, wurde die Bezeichnung "ultrafiltrierbares Virus", später Virus (lat. *Virus* = Gift) gewählt. Nahezu zeitgleich beschrieben Friedrich Loeffler und Paul Frosch 1897 als erstes tierpathogenes Virus den Erreger der Maul- und Klauenseuche (foot-and-mouth disease, FMDV) (Loeffler & Frosch, 1897). Kurze Zeit später wurde mit dem Erreger des Gelbfiebers das erste humanpathogene Virus beschrieben (Reed et al., 1900) und obwohl seit der Entdeckung von Viren mehr als hundert Jahre vergangen sind, konnten gegen die Mehrzahl aller Virusinfektionen bis jetzt keine wirksamen Therapien entwickelt werden. Um in den Infektionszyklus von Viren eingreifen zu können ist das Verständnis viraler Vermehrungsstrategien und der pathologischen Veränderungen die Viren in ihren Wirtszellen auslösen daher von zentraler Bedeutung.

Für die Erforschung von Picornaviren und anderen Viren mit positiv orientiertem RNA-Genom werden oft Reporterkonstrukte verwendet, in denen die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) mit einer internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) (siehe Kapitel 1.2.2) und die Sequenz für ein Reportergen oder ein Teil der originalen Sequenz des Polyproteins enthalten ist. Picornavirale IRES-Elemente werden in dicistronischen und multicistronischen Vektoren und viralen Replikonsystemen verwendet. Solche Konstrukte werden in der Gentherapie oder zur Analyse der Funktion der IRES-Elemente selbst verwendet (Borman & Jackson, 1992, de Felipe, 2002, Douin et al., 2004, Lee et al., 2004,

Niepmann et al., 1997, Xu et al., 2005). In diesen dicistronischen Konstrukten wird die Expression des ersten, vor der IRES gelegenen Reportergens als interne Kontrolle verwendet, mit deren Hilfe die Expression des zur Messung der IRES-Aktivität verwendeten zweiten, stromabwärts der IRES gelegenen Reportergens standardisiert wird.

## 1.1 Picornaviren

Picornaviren sind kleine (grch. *pico* = klein), hüllenlose Viren mit einem Durchmesser von etwa 30 nm und einem einzelsträngigen RNA-Genom mit positiver Orientierung. Zur Familie *Picornaviridae* gehören viele wichtige tier- und humanpathogene Viren, wie FMDV und der Erreger der Kinderlähmung, das Poliovirus. Picornaviren werden aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften (unter anderem Dichte im Cäsium-Chlorid-Gradienten und Säurestabilität) und nach ihrer Genomsequenz in neun verschiedene Gruppen eingeteilt (Tab. 1.1) (Flint et al., 2004).

**Tab. 1.1: Die Einteilung der Picornaviren**

Genus	Beispiel	Erkrankung
Enterovirus	Poliovirus (PV)	Poliomyelitis (Kinderlähmung)
Rhinovirus	Humanes Rhinovirus A	Schnupfen
Hepatovirus	Hepatitis A Virus (HAV)	Infektiöse Hepatitis
Cardiovirus	Encephalomyocarditis-Virus (EMCV)	Meningitis
Aphthovirus	Maul- und Klauenseuche-Virus (FMDV)	Maul- und Klauenseuche
Parechovirus	Humanes Parechovirus	Respiratorische und gastrointestinale Infektionen
Erbovirus	Equines Rhinovirus B	Respiratorische Infektionen
Kobuvirus	Aichi Virus	Gastroenteritis
Techovirus	Porcines Teschovirus	Polioencephalomyelitis

FMDV: foot-and-mouth disease virus; Quelle: Datenbank des International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTVdb), 2002 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>, Stand: 15. April 2007), <http://www.infektionsnetz.at/VirenPicornaviren.phtml>, Stand 15. April 2007

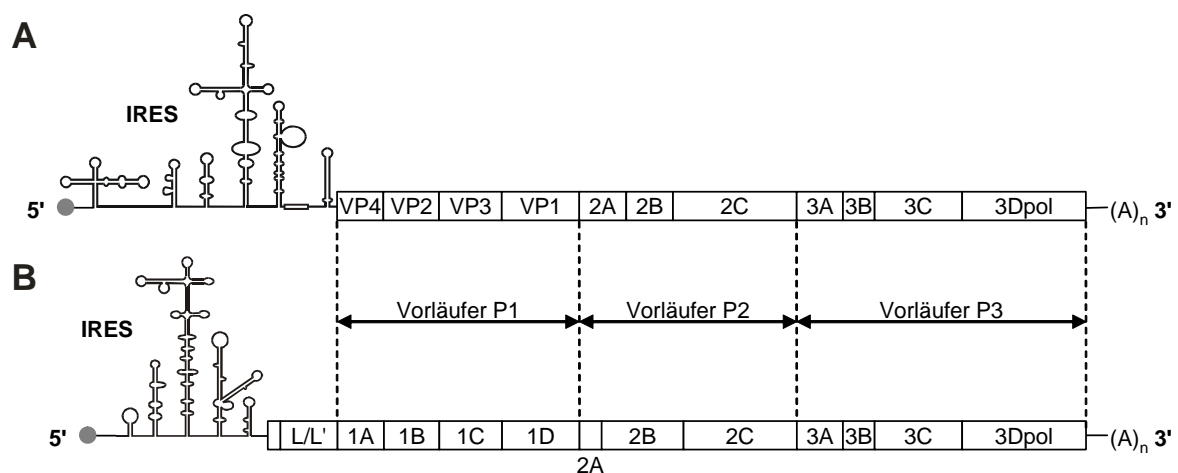
Zu den wichtigsten humanpathogenen Picornaviren zählen Poliovirus, Hepatitis A Virus (HAV) sowie verschiedene Coxsackie- und Rhinoviren. Poliovirus ist (neben FMDV, siehe unten) das am besten untersuchte Picornavirus und wurde 1909 von Karl Landsteiner und Erwin Popper erstmals beschrieben (Landsteiner & Popper, 1909). Poliovirus gehört zur großen Gruppe der pathogenen Enteroviren innerhalb der Picornaviren. Es gelangt durch orale Aufnahme in den Gastrointestinaltrakt, wo es repliziert und sich auch auf andere Gewebe ausbreiten kann. In etwa 1% der Infektionen gelangt Poliovirus in das zentrale Nervensystem (ZNS), wo es sich bevorzugt in den Motoneuronen des Rückenmarks vermehrt und diese zerstört. Dadurch kann es zu Lähmungen teilweise mit Todesfolge kommen (Mueller et al., 2005). Diese von Poliovirus verursachte Erkrankung wird als Poliomyelitis (grch. *polios* = grau und *myelos* = Substanz, gemeint ist die Ansammlung von Nervenzellkörpern im Rückenmark) bezeichnet. Gegen die drei pathogenetisch und immunologisch unterscheidbaren Serotypen Mahoney (Typ I), Lansing (Typ II) und Leon (Typ III) wurde Mitte der fünfziger Jahre von Albert Sabin ein Impfstoff entwickelt. Dieser Impfstoff enthält die drei lebenden, aber attenuierten (d.h. nicht mehr neurovirulenten) Poliovirus-Stämme. Dank des 1988 von der WHO (World Health Organization) initiierten Programms zur Ausrottung des Poliovirus (Global Polio Eradication Initiative) gilt Polio mit Ausnahme von Nigeria, Indien, Pakistan und Afghanistan weltweit als ausgerottet (WHO, 2007).



Bei den tierpathogenen Picornaviren ist der Erreger der Maul- und Klauenseuche (foot-and-mouth disease virus, FMDV) einer der ökonomisch bedeutensten. Das FMD-Virus befällt fast ausschließlich Paarhufer, insbesondere Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen. Eine Infektion mit FMDV beginnt an den Mukosae des Gastrointestinaltrakts, wo sich besonders im Maul- und Rachenraum sogenannte Primäraphten bilden. In diesen findet eine starke Virusvermehrung statt, und die Virionen treten über die Lymphe in die Blutbahn ein (Virämie). Es entstehen anschließend im Maul- und Rachenraum, aber auch an den Klauen Sekundäraphten, die unter anderem zu einer verminderten Nahrungsaufnahme des Tieres führen (Saiz et al., 2002). Maul- und Klauenseuche gilt heute in Europa als ausgerottet; einzelne Fälle von Maul- und Klauenseuche konnten auf die unzureichende Inaktivierung des Impfstoffs zurückgeführt werden (Beck & Strohmaier, 1987). In Afrika, dem Mittleren Osten, Asien und Teilen Südamerikas stellt Maul- und Klauenseuche allerdings nach wie vor eine der ökonomisch bedeutsamsten Tiererkrankungen dar (Geering & Lubroth, 1996).

### 1.1.1 Struktur und Genomorganisation

Picornaviren sind von einem durchschnittlich 30 nm großen Kapsid umgeben, in dem sich ein einzelsträngiges, positiv orientiertes RNA-Genom von etwa 7.500 bis 8.500 Nukleotiden Länge befindet. Nach dem Rezeptor-vermittelten Eintritt eines Picornavirus wird sein RNA-Genom in das Zytoplasma der Zelle entlassen, wo es direkt translatiert werden kann (Flint et al., 2004). Im Gegensatz zu den meisten zellulären mRNAs sitzt am 5'-Ende des picornaviralen Genoms ein kleines, viruskodiertes VPg-Protein (Virus Protein, genome encoded), das wahrscheinlich bei der Replikation der viralen RNA und bei der korrekten Verpackung der RNA in das Kapsid eine Rolle spielt (Franco et al., 2005, Kuhn et al., 1988, Rueckert, 1996).



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Genomorganisation von Picornaviren** am Beispiel von Poliovirus (A) und FMDV (B). Die Proteine des offenen Leserasters werden im Kap. 1.1.2 (Infektionszyklus) beschrieben. Der kleine, graue Kreis symbolisiert das VPg-Protein. Das Polyprotein der Picornaviren wird in drei Vorläufer (Precursor) P1, P2 und P3 eingeteilt, die zuerst als Einheiten erscheinen, dann aber weiter prozessiert werden (siehe auch Tab. 1.2). IRES: interne Ribosomen-Eintrittsstelle, (A)<sub>n</sub>: Poly(A)-Schwanz. Abbildung verändert aus Agol, 2002, Hershey & Merrick, 2000.

Der 5'-untranslatierte Bereich (5'-UTR) ist bei Picornaviren sehr lang und variiert zwischen etwa 600 Nukleotiden (nt) Länge bei Rhinoviren und ca. 1.200 nt bei Aphthoviren und beinhaltet meist mehrere AUG-Triplets (Pöyry et al., 1992). In der 5'-UTR befindet sich eine hochstrukturierte Region, die als interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) bezeichnet wird und die Cap-unabhängige Translation des

viralen Polyproteins steuert (siehe Kapitel 1.2.2). An die IRES schließt sich ein offenes Leseraster (open reading frame, ORF) an, das für ein langes Polyprotein kodiert, welches ko- und posttranslational durch virale und zelluläre Proteasen in kleinere Proteine gespalten wird (Tab 1.2).

**Tab. 1.2: Funktionen der Proteine von Picornaviren am Beispiel von Poliovirus und FMDV**

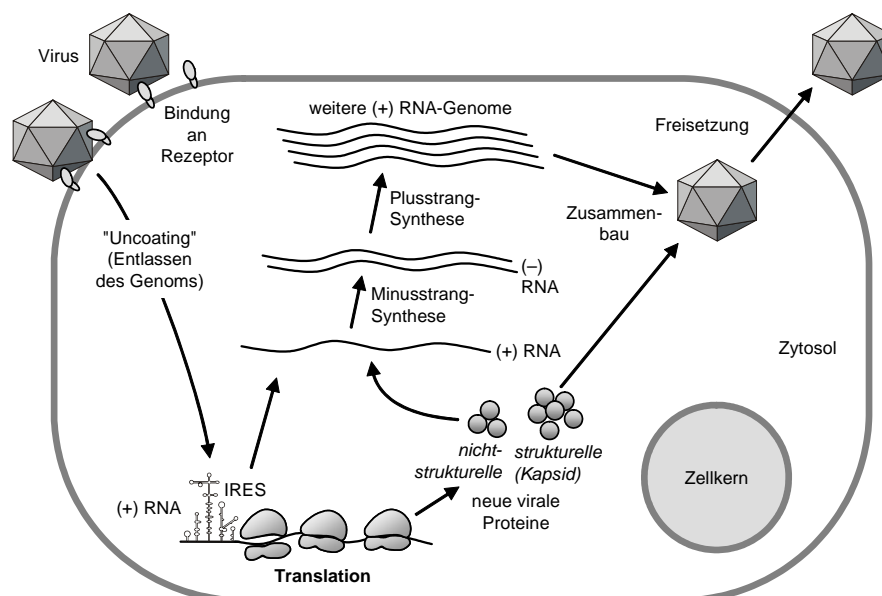
Precursor	Proteine	Aufgabe
P1	1A, 1B, 1C, 1D bzw. VP1, VP2, VP3, VP4	Kapsidproteine
P2	2A <sup>pro</sup>	PV: Protease, die die Abspaltung von P1 katalysiert und eIF4G spaltet FMDV: proteolytisch inaktiv; siehe L/L'-Protein
	2B, 2C	Funktion bei der Replikation
P3	3A	Induziert Änderungen in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums
	3B	Kodiert das VPg-Protein
	3C <sup>pro</sup>	3C <sup>pro</sup> ist zusammen mit seinem Precursor 3CD <sup>pro</sup> an der Prozessierung von P1, P2 und P3 beteiligt
	3D <sup>pol</sup>	RNA-Polymerase, synthetisiert Plus- und Minusstrang der viralen RNA
L/L'		Das L-Protein kommt nur bei Cardio- und Aphthoviren vor und spaltet den eukaryotischen Initiationsfaktor eIF4G

PV: Poliovirus; eIF: eukaryotischer Initiationsfaktor; FMDV: foot-and-mouth disease virus

Dem offenen Leseraster für das Polyprotein folgt eine weitere untranslatierte Region (3'-UTR), deren Ende ein Poly(A)-Schwanz unterschiedlicher Länge bildet (Abb. 1.1). Im Gegensatz zu dem Poly(A)-Schwanz einer zellulären mRNA, der post-transkriptional im Zellkern an die mRNA angehängt wird, ist dieser allerdings im Genom des Virus codiert und zusammen mit Strukturen in der 5'-UTR für die Initiation der Replikation verantwortlich (Andino et al., 1993).

### 1.1.2 Infektionszyklus

Nachdem ein Picornavirus über spezifische Rezeptoren in der Plasmamembran mit der Wirtszelle in Kontakt getreten ist, wird sein RNA-Genom in die Zelle entlassen. Diesen Prozess bezeichnet man als "uncoating" (Abb. 1.2).



**Abb.1.2: Schematische Darstellung des Infektionszyklus eines Picornavirus.**

Nach Bindung an den Rezeptor und dem Entlassen des Genoms wird die einzelsträngige, positiv orientierte RNA translatiert. Nach Umstellung von Translation auf Replikation synthetisiert die virale Polymerase Minusstrang-RNA, die dann als Matrize zur Synthese der Plusstrang-RNA verwendet wird. Nach Zusammenfügen von Kapsid und RNA werden die neuen Virione durch Lyse aus der Zelle freigesetzt.

Die einzelsträngige, positiv orientierte RNA eines Picornavirus steht direkt nach dem Entlassen aus dem Kapsid in die Zelle für die Translation zur Verfügung. In einem ersten Schritt wird nun das virale Polyprotein translatiert. Das Polyprotein der Picornaviren wird zuerst in drei Vorläufer (Precursor) P1, P2 und P3 prozessiert und diese dann weiter ko- und posttranslational durch virale und zelluläre Proteasen in die reifen viralen Proteine gespalten (Tab. 1.2). Während einige dieser Proteine später die Bestandteile des Kapsids bilden, sind andere an der Prozessierung der Precursor beteiligt oder haben Aufgaben bei der Replikation. Zu letzteren gehört die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RNA dependent RNA polymerase, RdRp), die für die Synthese von Minusstrang- und Plusstrang-RNA notwendig ist. Sobald die virale RNA-Polymerase synthetisiert ist, wird die genomische RNA als Matrize für die Synthese der Minusstrang-RNA verwendet. Die Synthese des Minusstrangs verläuft vom 3'-Ende in Richtung 5'-Ende der genomischen RNA und funktioniert nicht, solange sich translatierende Ribosomen auf der RNA befinden. Die Umstellung von Translation auf Replikation erfolgt bei Polioviren wahrscheinlich durch eine Interaktion des viralen Proteins 3CD mit einem Teil der 5'-UTR, dem sogenannten "Cloverleaf", so dass die Translation unterdrückt und die Replikation gefördert wird (Gamarnik & Andino, 1998). Die durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase neu synthetisierte Minusstrang-RNA dient dann als Matrize für die Synthese weiterer Plusstrang-RNA, die verschiedene Aufgaben erfüllt: Zum einen dient sie als Matrize für die Translation weiterer viraler Proteine und zum anderen ist sie das Template für die Synthese weiterer Minusstrang-RNA. Die Replikation des RNA-Genoms und die Zusammenlagerung der Kapside erfolgt assoziiert an den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums. Die neu synthetisierte Plusstrang-RNA wird von Kapsidproteinen umhüllt. Diese Virione werden meist durch Zelllyse freigesetzt werden und können dann weitere Zellen infizieren.

## **1.2 Mechanismen der Translation**

Die Proteinbiosynthese verläuft in drei Schritten: Initiation, Elongation und Termination der Translation. Die unterschiedlichen Möglichkeiten für die Initiation der Translation werden in den Kapiteln 1.2.1 und 1.2.2 näher beschrieben. Nach dem Beginn der Proteinsynthese sind dann die weiteren Abläufe bei der Elongation identisch, während über mögliche Unterschiede bei der Termination noch wenig bekannt ist.

Für die Initiation der Translation existieren prinzipiell zwei Möglichkeiten. Zum einen kann die Translation direkt an der 7-Methylguanosin-Kappe ( $m^7GpppN$ , "Cap") am 5'-Ende einer mRNA durch Bindung eines Proteinkomplexes von Initiationsfaktoren beginnen, zum anderen kann die Translation intern an einer stark gefalteten und durch Basenpaarungen stabilisierten Struktur in der 5'-UTR der RNA, einer sogenannten internen Ribosomen-Eintrittsstelle, initiiert werden. Obwohl die Translation der meisten zellulären mRNAs Cap-abhängig an ihrem 5'-Ende initiiert wird (Kapitel 1.2.1), sind neben einigen viralen (Kapitel 1.2.2) auch einige wenige zelluläre RNAs in der Lage, die Translation Cap-unabhängig mittels einer internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) zu initiieren. Die IRES-Elemente in zellulären mRNAs ermöglichen wahrscheinlich die Translation, wenn die Cap-abhängige Translation beeinträchtigt ist. Dies ist insbesondere während der G2/M-Phase im Zellzyklus der Fall, aber auch bei der Apoptose und in Phasen zellulären Stresses (Hellen & Sarnow, 2001). Ein kürzlich erschienener Übersichtsartikel zu diesem Thema listet über 80 zelluläre mRNAs mit einer Internen Ribosomen-Eintrittsstelle (Baird et al., 2006), und in der von der Arbeitsgruppe Vagner initiierten

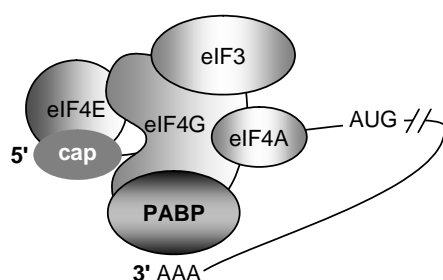
IRES-Datenbank finden sich über 50 Einträge zu zellulären IRES-Elementen (Bonnal et al., 2003). Die meisten der zellulären mRNAs werden allerdings Cap-abhängig translatiert.

### 1.2.1 Cap-abhängige Initiation der Translation

Nach der Synthese der prä-mRNA werden im Nukleus einige Modifikationen an ihr vorgenommen: Durch Spleißen werden vorhandene Introns entfernt und es erfolgt die Anlagerung eines Cap-Nukleotids (m<sup>7</sup>Gppp) am 5'-Ende und eines Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA. Der Poly(A)-Schwanz erfüllt mehrere Aufgaben: Er dient als Signal zum Transport der mRNA aus dem Nukleus in das Zytoplasma, stabilisiert die mRNA und dient der Regulation der Translation. Auch das Cap-Nukleotid hat mehrere Funktionen, es dient ebenfalls der Stabilisierung der mRNA und dem Transport aus dem Nukleus. Die wichtigste Funktion des Cap-Nukleotids besteht in der Einleitung der Translation. Zwischen dem Cap-Nukleotid und dem Beginn der proteinkodierenden Sequenz befindet sich ein Bereich von etwa 50 bis 100 Nukleotiden, die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR). Dem sich anschließenden offenen Leseraster folgt eine 3'-untranslatierte Region (3'-UTR), die aus einigen zehn bis hundert Nukleotiden besteht. An ihrem 3'-Ende trägt sie einen Poly(A)-Schwanz, der aus bis zu 250 Adenin-Nukleotiden bestehen kann. Neben seiner Funktion der Stabilisierung der mRNA spielt der Poly(A)-Schwanz auch bei der Regulation der Translation eine Rolle (Knapinska, 2005).

Bei der Cap-abhängigen Initiation der Translation sind neben der 40S- und der 60S-ribosomalen Untereinheit mehrere eukaryotische Initiationsfaktoren (eIF) beteiligt. Einen Überblick über die Initiationsfaktoren und zellulären Faktoren, die an der Initiation der Translation beteiligt sind, geben Tab. 1.3 und Abb. 1.4. Vor der eigentlichen Initiation der Translation müssen die 80S-Ribosomen in ihre Untereinheiten dissoziieren. Dies geschieht durch die Bindung von eIF3 und eIF1A an die 40S-ribosomale Untereinheit, so dass eine Anlagerung an die 60S-ribosomale Untereinheit verhindert wird. Der ternäre Komplex, der sich aus Initiator-tRNA (Met-tRNA<sub>i</sub>) und dem mit GTP beladenen Initiationsfaktor eIF2 bildet, lagert sich an die 40S-Untereinheit an und bildet so den 43S-Präinitiationskomplex.

Der Cap-bindende Proteinkomplex eIF4F, der aus den Initiationsfaktoren eIF4E, eIF4G und eIF4A besteht, bindet über eIF4E an das Cap-Nukleotid am 5'-Ende der mRNA. eIF4A ist eine RNA-Helikase, die unter ATP-Verbrauch und mit Hilfe des Kofaktors eIF4B doppelsträngige Bereiche der mRNA aufwindet. eIF4G hat sowohl für eIF4A und eIF4E Bindungsstellen als auch für das Poly(A)-bindende Protein PABP und für eIF3 und vermittelt den Kontakt zwischen 43S-Präinitiationskomplex und mRNA (Imataka et al., 1998, Lamphear et al., 1995, Morino et al., 2000). Über die Bindung von PABP kommt es zu einer Interaktion zwischen dem Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA und dem am 5'-Ende bindenden Proteinkomplex eIF4F (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Initiationskomplexes eIF4F und seiner Interaktion mit PABP.** eIF4G bildet mit dem Cap-bindenden Protein eIF4E und der RNA-Helikase eIF4A den Initiationskomplex eIF4F. eIF4G hat auch Bindungsstellen für eIF3 und Poly(A)-bindendes Protein (PABP). Durch die Bindung von PABP an eIF4G kommt es zu einer Interaktion zwischen dem 5'- und dem 3'-Ende der mRNA.

**Tab. 1.3: Eukaryotische Initiationsfaktoren und zelluläre Faktoren**, die wichtig für die Initiation der Translation sind. Eukaryotische Initiationsfaktoren (eIF) sind spezifische, nicht-ribosomal assoziierte Proteine, die für die korrekte Initiation der Translation unerlässlich sind.

eIF	Isof.	UE	kDa*	Funktion
eIF1			12,7	Positioniert die mit Methionin beladene tRNA <sub>i</sub> am Start-Codon.
eIF1A			16,5	Bindet an dissoziierte 40S-Untereinheiten und verhindert so die Bindung der 60S-Untereinheit. Stabilisiert möglicherweise die Bindung der Met-tRNA <sub>i</sub> an die 40S-Untereinheit.
eIF2		2α 2β 2γ	36,1 38,4 51,1	eIF2 bildet zusammen mit GTP und der Initiator-tRNA den ternären Komplex. Dieser Komplex bindet an die 40S-ribosomale Untereinheit und anschließend an die mRNA und bildet so den 43S-Präinitiationskomplex. Nach Hydrolyse des an eIF2 gebundenen GTP und der Freisetzung des GDP-eIF2-Komplexes bindet die 60S-ribosomale Untereinheit und formt so das 80S-Ribosom. Um für eine erneute Initiation zur Verfügung zu stehen, muss eIF2 regeneriert werden. Dazu wird das an eIF2 gebundene GDP mit GTP ersetzt. Diese Reaktion wird durch eIF2B katalysiert.
eIF2B				Katalysiert den Austausch des an eIF2 gebundenen GDP zu GTP.
eIF3		12 UE <sup>1)</sup>		Durch die Bindung von eIF3 und eIF1A an die ribosomale Untereinheit 40S wird eine Re-Assoziation mit der 60S-Untereinheit verhindert. eIF3 bindet bei der Initiation der Translation an eIF4G.
eIF4A	eIF4AI eIF4AII		46,2 46,4	Teil des Proteinkomplexes eIF4F. eIF4A ist eine ATP-abhängige RNA-Helikase, die unter ATP-Verbrauch Sekundärstrukturen der RNA entwindet.
eIF4B			69,1	Kofaktor von eIF4A, stimuliert die Helikase-Aktivität von eIF4A.
eIF4E			25,1	Teil des Proteinkomplexes eIF4F. Erkennt und bindet das Cap-Nukleotid am Ende der 5'-UTR der mRNA. Die Aktivität von eIF4E wird durch eIF4E-bindende Proteine (4E-BP) und Mnk1 reguliert.
eIF4E-BP	4E-BP1 4E-BP2 4E-BP3		12,6 12,9 10,9	Nicht-phosphoryliertes 4E-BP reguliert die Aktivität von eIF4E, indem es die Einlagerung von eIF4E in den eIF4F-Komplex verhindert. eIF4-BP kann durch verschiedenen zelluläre Kinasen phosphoryliert werden und dann seine Aufgabe nicht mehr wahrnehmen.
eIF4F				Proteinkomplex, bestehend aus eIF4A, eIF4E, eIF4G.
eIF4G	4G1 4G2 4G3		175,5 102,3 176,7	Bindet sowohl an eIF4E als auch an eIF4A und bildet mit diesen den Proteinkomplex eIF4F. eIF4G besitzt Bindungsstellen für eIF4A, eIF4E, eIF3 und PABP. Durch Interaktion von PABP und eIF4G kommt es zu einer Zirkularisierung der mRNA. eIF4G2 spielt wahrscheinlich beim Wechsel von cap-abhängiger zu IRES-abhängiger Translation bei Mitose, Apoptose und viraler Infektion eine Rolle. eIF4G3 ist ein funktionelles Homolog zu eIF4G1.
eIF5			49,2	Erreicht der 43S-Präinitiationskomplex das Start-Codon, stimuliert eIF5 die GTPase-Aktivität von eIF2. Nach Hydrolyse des an eIF2 gebundenen GTP und der Freisetzung des GDP-eIF2-Komplexes bindet die 60S-ribosomale Untereinheit an die RNA und die Proteinsynthese beginnt.
eIF5B			138,8	Stimuliert (in Abwesenheit von eIF5) die GTPase-Aktivität von eIF2. Vermittelt die Anlagerung der 60S-Untereinheit, nachdem der Initiationskomplex das Start-Codon erreicht hat.
Mnk1				MAPK <sup>2)</sup> -integrating protein kinase; phosphoryliert das im Proteinkomplex eIF4F an eIF4G gebundene eIF4E. Die Phosphorylierung von eIF4E erhöht seine Affinität für das Cap-Nukleotid am 5'-Ende der mRNA.
PABP			70,7	Poly(A)-bindendes Protein. Bindet an eIF4F und an das poly(A)-Ende der mRNA und bringt so 3'-UTR und 5'-UTR der RNA in eine räumliche Nähe zueinander.

\* Molekulargewicht lt. SwissProt-Datenbank ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) für humanes Protein; Isof: Isoform; UE: Untereinheit; eIF: eukaryotischer Initiationsfaktor; UTR: untranslatierte Region; PABP: poly(A)-binding protein; Mnk: MAP kinase-interacting serine/threonine protein kinase.

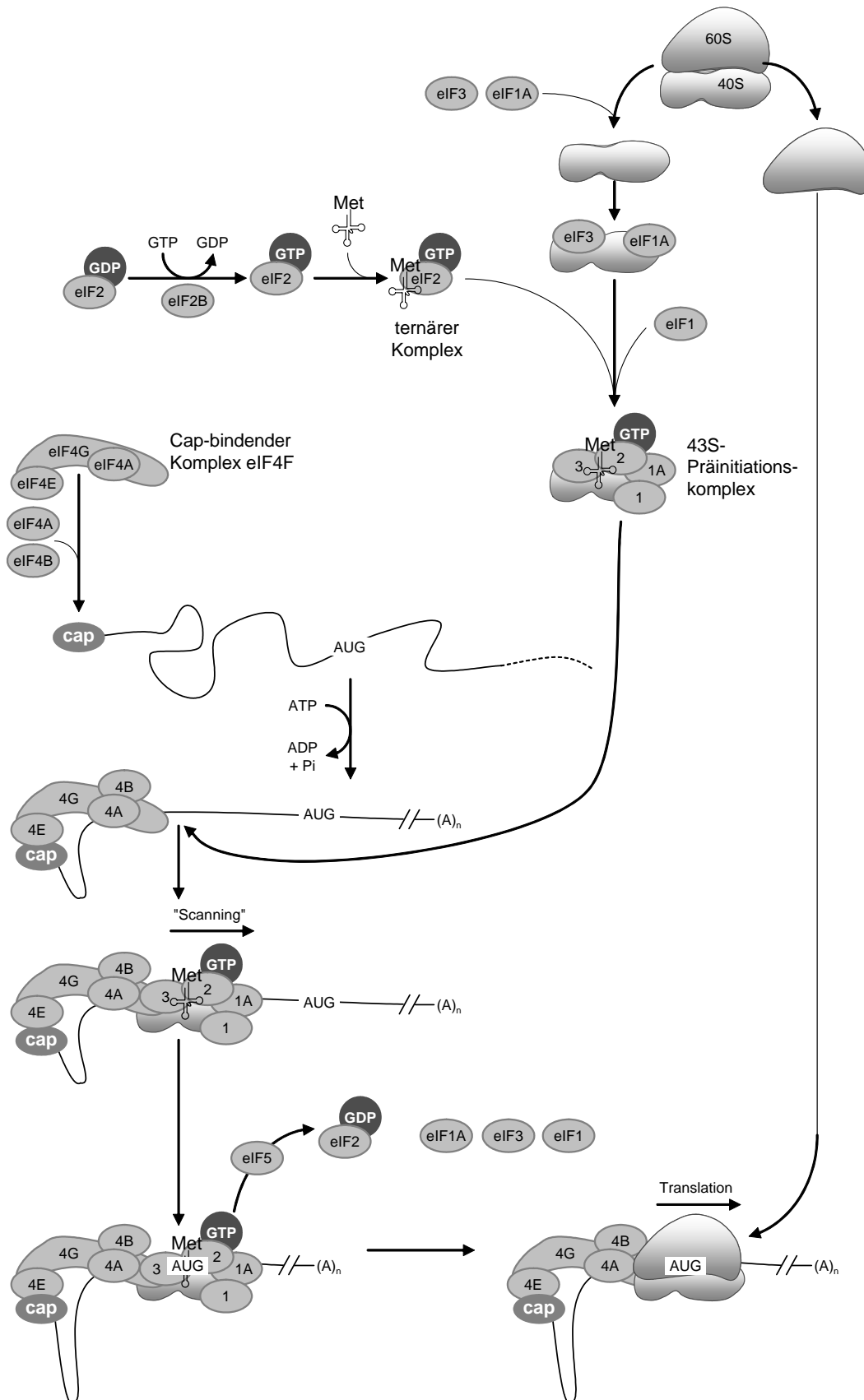
1) eIF3 besteht aus zwölf Untereinheiten, die mit Ausnahme von UE6-IP (Untereinheit 6-interacting protein) nach ihrem Laufverhalten im SDS-Gel benannt sind (p35, p36, p40, p44, p47, p48, p66, p110, p116, p167, p25/p28, UE6-IP). 2) Mitogen-activated protein kinase.

Zusammengestellt aus Hellen & Sarnow, 2001, Hershey & Merrick, 2000, IUBMB, 1996, Pain, 1996, Pyronnet, 2000.

In einem Prozess, der als "Scanning" (Abtasten) bezeichnet wird, sucht der 43S-Präinitiationskomplex die mRNA stromabwärts nach einem Start-Codon ab. Bei diesem Prozess wird ATP verbraucht, wobei noch nicht endgültig geklärt ist, ob die dadurch bereit gestellte Energie direkt für die Bewegung des Ribosoms auf der mRNA oder indirekt für das Glätten von RNA-Sekundärstrukturen verwendet wird (Gingras et al., 1999, Pestova & Kolupaeva, 2002). Eine Basenpaarung zwischen dem Met-tRNA<sub>i</sub>-Anti-Codon und dem Start-Codon AUG erfolgt, wenn sich das Start-Codon in einem optimalen Nukleotid-Kontext befindet. In dieser sogenannten Kozak-Sequenz paaren dann Met-tRNA<sub>i</sub>-Anti-Codon und Start-Codon (Kozak, 1986). Bei der Selektion des optimalen Start-Codons sind auch die beiden Initiationsfaktoren eIF1 und eIF1A beteiligt (Pestova et al., 1998). Nach Basenpaarung mit dem Met-tRNA<sub>i</sub>-Anticodon stimuliert eIF5 die GTPase-Aktivität von eIF2. Die Hydrolyse des an eIF2 gebundenen GTP zu GDP und das Freisetzen von eIF2-GDP muss erfolgen, damit sich die 60S-Untereinheit überhaupt an die 40S-Untereinheit anlagern und so das Ribosom vervollständigen kann. eIF2-GDP, eIF1A und eIF3 dissoziieren von der 40S-Untereinheit ab und vermittelt von eIF5B erfolgt die Anlagerung der 60S-ribosomalen Untereinheit (Jackson, 2005). eIF2B tauscht im eIF2-GDP-Komplex GDP zu GTP aus, so dass eIF2-GTP für eine weitere Runde der Initiation zur Verfügung steht.

Durch die Zusammenlagerung der beiden ribosomalen Untereinheiten und die Ausbildung einer stabilen Wechselwirkung zwischen dem Start-Codon und dem Anti-Codon der Met-tRNA<sub>i</sub> liegt der Startpunkt der Translation fest. In dem sich anschließenden Schritt, der Elongation, erfolgt nun die Verknüpfung von Aminosäuren zu einer Peptidkette. Ein Ribosom besitzt drei für die Proteinbiosynthese wichtige Bereiche: den Erkennungsort, den Bindungsort und den Ausgangsort. Am Erkennungsort (*A-Site*) bindet die zum Triplet der RNA passende Aminoacyl-tRNA, der Bindungsort (*P-Site*) ist der Bereich, an dem die Aminosäuren durch eine Peptidyl-Transferase miteinander verbunden werden und der Ausgangsort (*E-Site*) ist der Bereich, an dem die leere tRNA anschließend freigesetzt wird. Der Prozess der Proteinbiosynthese verbraucht Energie in Form von ATP und GTP und benötigt verschiedene eukaryotische Elongationsfaktoren (eEFs).

Bei Erreichen eines Stop-Codons wird die Termination der Translation eingeleitet. Die Proteinsynthese wird beendet und in Gegenwart von Terminationsfaktoren (*release factors*, RFs) katalysiert die Peptidyl-Transferase die Freisetzung der synthetisierten Polypeptidkette. Anschließend dissoziiert der Translationskomplex von der mRNA ab und das Ribosom zerfällt in seine beiden Untereinheiten. Diese Dissoziation wird durch Bindung von eIF3 und eIF1A an die 40S-ribosomale Untereinheit aufrechterhalten; ein Zusammenfügen der beiden ribosomalen Untereinheiten findet erst wieder bei der Initiation der Translation statt.



**Abb. 1.4: Modell der cap-abhängigen Initiation der Translation bei Eukaryoten.** eIF: eukaryotische Initiationsfaktoren; Met: Methionin; 40S: kleine ribosomale Untereinheit; 60S: große ribosomale Untereinheit. Verändert nach Pain, 1996, Jackson, 2000, Lopez-Lastra et al., 2005.

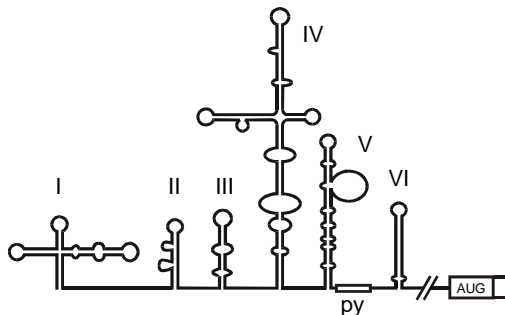
### 1.2.2 Initiation der Translation durch eine picornvirale interne Ribosomen-Eintrittsstelle

Im Vermehrungszyklus von Picornaviren ist die Initiation der Translation neben dem Eintritt in die Zelle und der Prozessierung des Polyproteins der wichtigste regulierte Schritt. Das RNA-Genom der Picornaviren besitzt keine Cap-Struktur am 5'-Ende und hat eine lange 5'-UTR mit mehreren Start-Codons. Obwohl diese beiden Faktoren gegen eine optimale Translation des Polyproteins sprechen, können Picornaviren ausgesprochen effektiv translatieren, selbst wenn die Cap-abhängige Translation der Zelle blockiert ist. Alle Picornaviren besitzen in der 5'-UTR ihres Genoms eine hoch strukturierte Region, die interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES).

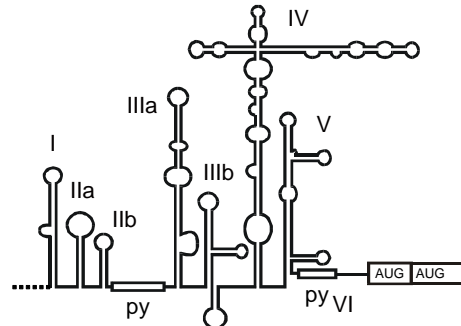
Die Entdeckung von IRES-Elementen in der 5'-UTR von Picornaviren im Jahr 1988 brach mit dem Dogma, dass die Translation von RNAs ausschließlich über das Cap-Nukleotid an ihrem 5'-Ende initiiert werden kann (Jang et al., 1988, Pelletier & Sonenberg, 1988). IRES-Elemente wurden nicht nur bei Picornaviren gefunden, es gibt sie auch bei Pestiviren und HCV, die zur Familie *Flaviridae* gehören (Brown et al., 1992, Tsukiyama-Kohara et al., 1992, Wang et al., 1993). Diese viralen IRES-Elemente werden aufgrund ihrer Primär- und Sekundärstruktur in vier verschiedene Typen unterteilt (Abb. 1.5). Bei den Picornaviren werden die IRES-Elemente der Entero- und Rhinoviren als Typ I-IRES klassifiziert, die Cardio- und Aphthoviren haben eine IRES des Typs II und Hepatitis A Virus ein IRES-Element des Typs III. Eine vierte Gruppe von IRES-Elementen findet sich bei HCV und Pestiviren (Brown et al., 1992, Wang et al., 1993).

#### *Picornaviridae*

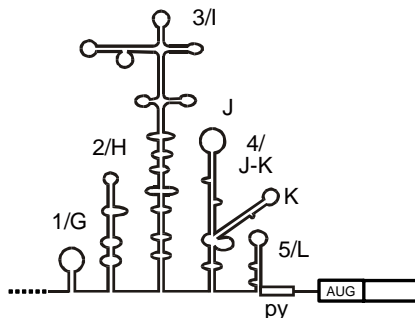
##### I. Entero- /Rhinoviruses



##### III. Hepatitis A Virus

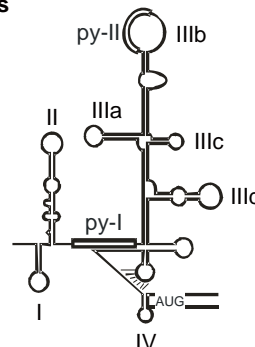


##### II. Cardio- /Aphthoviruses



#### *Flaviridae*

##### IV. Hepatitis C Virus Pestivirus



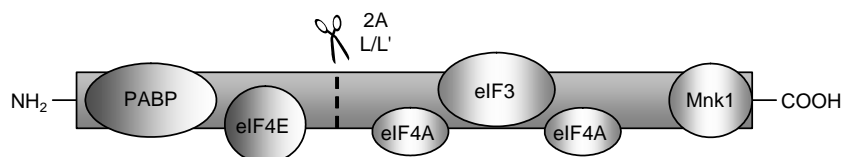
**Abb. 1.5: Organisation viraler IRES-Elemente** bei Picornaviren (Typ I bis Typ III) und dem Typ IV IRES-Element von Hepatitis C Virus und Pestiviren. Die dargestellten IRES-Elemente sind von Poliovirus (Typ I), FMDV (Typ II), Hepatitis A Virus (Typ III) und Hepatitis C Virus (Typ IV). Die Stem-Loops sind nummeriert. Verändert aus Niepmann, 1999.



Charakteristisch für alle IRES-Elemente sind ihre durch Basenpaarungen entstehenden Stem-Loop-Bereiche (engl. *stem* = Stamm, *loop* = Öse, Schlaufe). In allen internen Ribosomen-Eintrittsstellen existiert ein großer, zentraler "Stem" sowie mehrere kleinere Stem-Loop-Bereiche, die in Größe und Anzahl stark variieren. Im Bezug auf die Sekundärstruktur existieren bei den Picornaviren Gemeinsamkeiten, auf der Ebene der Primärsequenz jedoch kaum (Jackson & Kaminski, 1995). Konservierte Regionen befinden sich vorwiegend in einzelsträngigen Bereichen, die wahrscheinlich für die Bindung zellulärer Proteine oder zur Bildung einer Tertiärstruktur benötigt werden (Pilipenko et al., 1992). In den basengepaarten Bereichen finden sich hingegen bevorzugt nicht-konservierte Bereiche.

Eine wichtige Abgrenzung der picornaviralen IRES-Elemente gegenüber denen der Pestiviren und HCV ist die Benutzung zellulärer Initiationsfaktoren. Während Pestiviren und HCV für die interne Initiation der Translation außer eIF3 und eIF2 keine weiteren Initiationsfaktoren benötigen, nutzen Picornaviren alle Initiationsfaktoren außer dem Cap-bindenden Protein eIF4E für die Initiation der Translation (Pestova et al., 1996a). Neben diesen auch bei der zellulären Translationsinitiation verwendeten Faktoren benutzen Picornaviren auch einige zelluläre Proteine wie zum Beispiel La Protein und Polypyrimidin Trakt-bindendes Protein (polypyrimidine tract binding protein, PTB), die in Zellen normalerweise nicht an der Proteinbiosynthese beteiligt sind. Diese Faktoren scheinen die IRES-gesteuerte Translation zu stimulieren (Jackson, 2002).

Nach Infektion einer Zelle steht das positiv orientierte, einzelsträngige RNA-Genom der Picornaviren sofort für die Translation zur Verfügung. Dazu bindet das Adaptor-Protein eIF4G an einen zentralen Stem-Loop in der internen Ribosomen-Eintrittsstelle und vermittelt so über eIF3 den Kontakt zwischen 43S-Präinitiationskomplex und viraler RNA. Durch die Translation und die weitere Prozessierung viraler Proteine entsteht bei FMDV und Poliovirus eine Protease, die eIF4G in zwei Fragmente spaltet. Bei der Spaltung durch die picornavirale Protease wird eIF4G in einen N-terminalen Teil mit der Bindungsstelle für eIF4E und einen C-terminalen Teil mit der Bindungsstelle für eIF4A und eIF3 gespalten (Abb. 1.6). Picornaviren benötigen für die Initiation der Translation an ihrer internen Ribosomen-Eintrittsstelle nicht das Cap-bindende Protein eIF4E, sondern nur den C-terminalen Teil von eIF4G, der durch seine Bindungsstelle für eIF3 den Kontakt zur kleinen ribosomalen Untereinheit herstellt (Prevot et al., 2003). Während also zu Beginn der Infektion noch das vollständige Adaptor-Protein eIF4G zur Initiation der Translation zur Verfügung steht, wird im weiteren Verlauf der Infektion die Cap-abhängige Translationsinitiation zellulärer mRNAs ausgeschaltet ("Shut-off").



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF4G.** Die gestrichelte Linie zeigt die Schnittstelle der 2A-Protease von Poliovirus bzw. der L/L'-Protease von FMDV; PABP: Poly(A)-bindendes Protein, eIF: eukaryotischer Initiationsfaktor, Mnk1: MAP kinase-integrating protein kinase. Verändert nach Prevot et al., 2003.

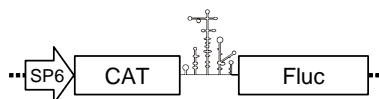
Nachdem eIF4G (oder sein C-terminales Fragment) an die IRES gebunden und den Kontakt zum 43S-Präinitiationskomplex hergestellt hat, scannt dieser Komplex nun die virale RNA stromabwärts bis zum Erreichen eines authentischen Start-Codons. Nach dem Erreichen des Start-Codons

dissoziieren eIF2-GDP, eIF1A und eIF3 von der 40S-Untereinheit ab und das durch Anlagerung der 60S-Untereinheit gebildete Ribosom beginnt die Synthese des viralen Polyproteins. Die weitere Synthese (Elongation) und die Termination der Translation verlaufen wie bei zellulären mRNAs (siehe Kapitel 1.2.1).

### 1.3 Ziele dieser Arbeit

Bei der Analyse dicistronischer Konstrukte mit verschiedenen Mutanten der FMDV-IRES konnten unterschiedliche Translationseffizienzen auch für den stromaufwärts der IRES gelegenen Reporter beobachtet werden (Bassili, 2003). Die Stimulation der Translation des ersten Reporters trat dabei nur unter physiologischen Salzbedingungen (etwa 130 mM K<sup>+</sup>) auf. Daraus resultierten mehrere Fragen, die in der vorliegenden Arbeit geklärt werden sollten:

- i. Zeigt diesen Effekt nur eine FMDV-IRES, oder verstärkt auch ein anderes picornavirales IRES-Element die Translation des stromaufwärts gelegenen Reporters unter physiologischen Salzbedingungen?
- ii. Wird durch eine Picornavirus-IRES nur die Translation eines bestimmten stromaufwärts der IRES gelegenen Reportergens verstärkt oder ist dieser Effekt unabhängig von der Sequenz des stromaufwärts gelegenen Gens?
- iii. Wirkt die Stimulation der Translation des ersten Reporters in *cis* oder auch in *trans*?
- iv. Ist die Elongation der Translation des stromabwärts der IRES gelegenen Reporters für diesen Effekt erforderlich?
- v. Welcher Mechanismus liegt dieser Stimulation zugrunde und welche zellulären Faktoren sind daran beteiligt?



**Abb. 1.7: Schematische Darstellung eines dicistronischen Reporterkonstrukts.** Dem Promoter für die SP6-Polymerase (SP6) folgt das erste Reportergen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), die interne Ribosomen-Eintrittsstelle von FMDV und das zweite Reportergen Firefly-Luciferase (Fluc).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Verstärkung der Translation unabhängig von der Natur des ersten Reportergens und von der Translation des zweiten stromabwärts gelegenen Reportergens erfolgt. Dieser Verstärkungseffekt erfolgt in *cis* und er tritt nicht bei Verwendung einer HCV-IRES auf. Auch bei Verwendung einer mutierten Picornavirus-IRES, die zwar noch die Bindungsstelle für eIF4G, aber keine IRES-Aktivität mehr aufweist, wird die Translation des stromaufwärts gelegenen Reporters noch effizient verstärkt. Der Effekt der Translations-Verstärkung kann durch kompetierendes Cap-Nukleotid gehemmt werden, was zeigt, dass eIF4F der entscheidend an diesem Vorgang beteiligte Faktor ist. Auch nachdem eIF4G mittels einer picornaviralen Protease gespalten wird, kann der erste Reporter noch effizient translatiert werden; das C-terminale Fragment von eIF4G ist also für die Verstärkung der Translation des ersten Reporters ausreichend.

Interne Ribosomen-Eintrittsstellen (IRES) von Picornaviren fördern also nicht nur die Translation des stromabwärts der IRES gelegenen Gens, sondern – unter physiologischen Salzbedingungen – auch die Translation eines stromaufwärts gelegenen Gens. Die Kenntnis dieses Effektes hat Auswirkungen auf die Interpretation der Ergebnisse von Replikations- und Translationsstudien mit dicistronischen Replikonsystemen und das Design viraler Replikonsysteme.

## 2. Ergebnisse

Interne Ribosomen-Eintrittsstellen (IRES) von Picornaviren fördern die Translation des stromabwärts gelegenen Gens. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sie in dicistronischen RNAs auch die Translation eines stromaufwärts der IRES gelegenen Gens verstärken können.

### 2.1 Eine Picornavirus-IRES in dicistronischen Konstrukten kann unter physiologischen Salzkonzentrationen die Translation des ersten Reportergens verstärken

Picornavirale IRES-Elemente werden vor allem in viralen Replikonsystemen, aber auch in dicistronischen (oder multicistronischen) Vektoren in der Gentherapie oder zur Analyse der Funktion der IRES-Elemente selbst verwendet (Borman & Jackson, 1992, de Felipe, 2002, Douin et al., 2004, Lee et al., 2004, Niepmann et al., 1997). In solchen Vektoren wird die Expression des ersten, vor der IRES gelegenen Reportergens oft als interne Kontrolle verwendet, mit deren Hilfe die Expression des zur Messung der IRES-Aktivität verwendeten zweiten, stromabwärts der IRES gelegenen Reportergens standardisiert wird.

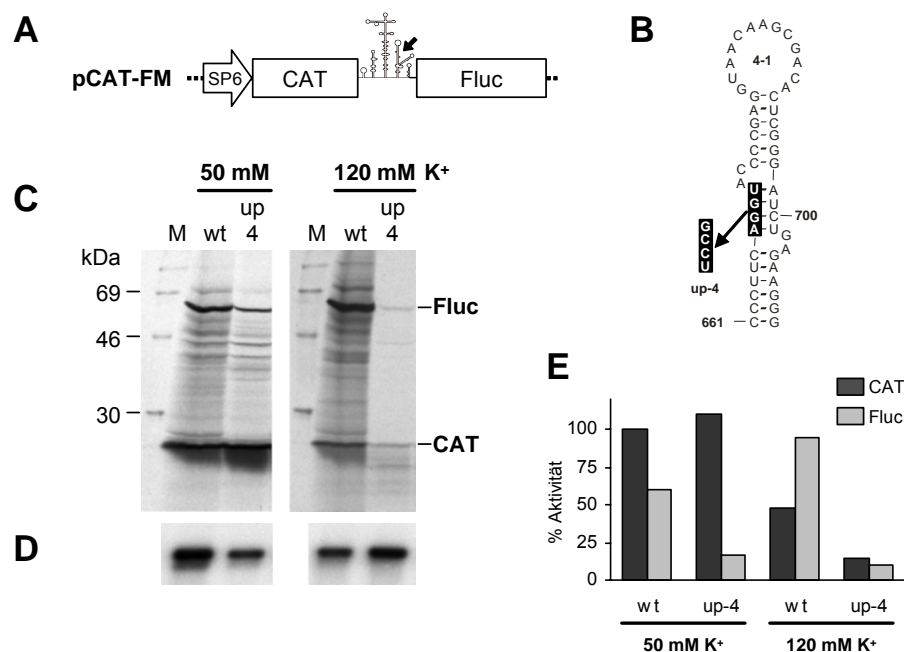
Bei der Analyse verschiedener Mutanten der FMDV-IRES und deren Wirkung auf die Bindung des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF4G an die IRES (Bassili, 2003) kam es beim Vergleich der Translationseffizienz der Wildtyp-IRES mit der Mutation up-4 in den dicistronischen Konstrukten pCAT-FM-wt bzw. pCAT-FM-up-4 zu einer überraschenden Beobachtung: Während bei Niedrigsalzbedingungen (50 mM K<sup>+</sup>) die Expression des ersten Reportergens vor der IRES sowohl bei Verwendung einer Wildtyp-FMDV-IRES als auch bei Verwendung einer mutierten FMDV-IRES in etwa die gleiche Stärke hat, ist die Expression unter physiologischen Salzbedingungen (120 mM K<sup>+</sup>) unterschiedlich stark; der vor der IRES gelegene Reporter wird bei Verwendung einer mutierten FMDV-IRES deutlich schwächer translatiert als bei Verwendung einer Wildtyp-IRES (Abb. 2.1).

Die dicistronischen RNAs CAT-FM-wt und CAT-FM-up-4 enthalten das Reportergen für Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), gefolgt von der IRES des Maul- und Klauenseuche Virus (foot-and-mouth disease virus, FMDV) und dem zweiten, IRES-abhängig translatierten Reportergen Firefly Luziferase (Fluc) (Abb. 2.1A). Während das Konstrukt CAT-FM-wt eine Wildtyp-IRES trägt, beinhaltet CAT-FM-up-4 eine FMDV-IRES, bei der vier Nukleotide im apikalen Bereich des Stem-Loop 4 mutiert worden sind (Abb. 2.1B). Dadurch ändert sich nicht nur die Sequenz, sondern es kommt es auch zu einer Veränderung der Sekundärstruktur: Die Paarung der Nukleotide in diesem Bereich ist gestört, der Stem-Loop löst sich auf und eine Blase entsteht. Eine so mutierte IRES ist deutlich schlechter in der Lage, eukaryotische Initiationsfaktoren (insbesondere eIF4G) zu binden (Bassili et al., 2004).

Wurden mit diesen beiden Konstrukten nun *in vitro*-Experimente durchgeführt, so war die Expression des zweiten Reporters Firefly Luziferase (Fluc) bei niedrigen Salzkonzentrationen (50 mM K<sup>+</sup>) bei Verwendung der dicistronischen RNA mit der Mutation up-4 wie erwartet deutlich niedriger als bei Verwendung einer Wildtyp-IRES. Die Expression des ersten Reporters CAT war ungefähr gleich und konnte in diesem Fall als interner Standard zur Normalisierung der für Fluc erhaltenen Werte verwendet werden.

Bei Translation dieser dicistronischen RNAs bei einer Salzkonzentration von 120 mM K<sup>+</sup> war die Expression des zweiten Reportergens Fluc bei Verwendung einer Wildtyp-IRES stärker als bei Verwendung einer mutierten IRES und entsprach somit etwa dem bereits bei Niedrigsalz beobachteten

Ergebnis. Allerdings veränderte sich die Expression des ersten, stromaufwärts der IRES gelegenen Reporters: Bei Verwendung der Mutation CAT-FM-up-4 ist die Expression des ersten Reporters schwach, während eine Wildtyp-IRES auch unter physiologischen Salzbedingungen in der Lage ist, die Expression des ersten Reporters aufrecht zu erhalten (Abb. 2.1C). Da diese Unterschiede in der Expression der Proteine auch durch unterschiedliche Mengen RNA entstehen könnten, wurden von Y. Song Northern-Blots gemacht. Diese zeigen, dass die Unterschiede in der Expression keine Folge eines unterschiedlichen Abbaus der RNA sind (Abb. 2.1D).



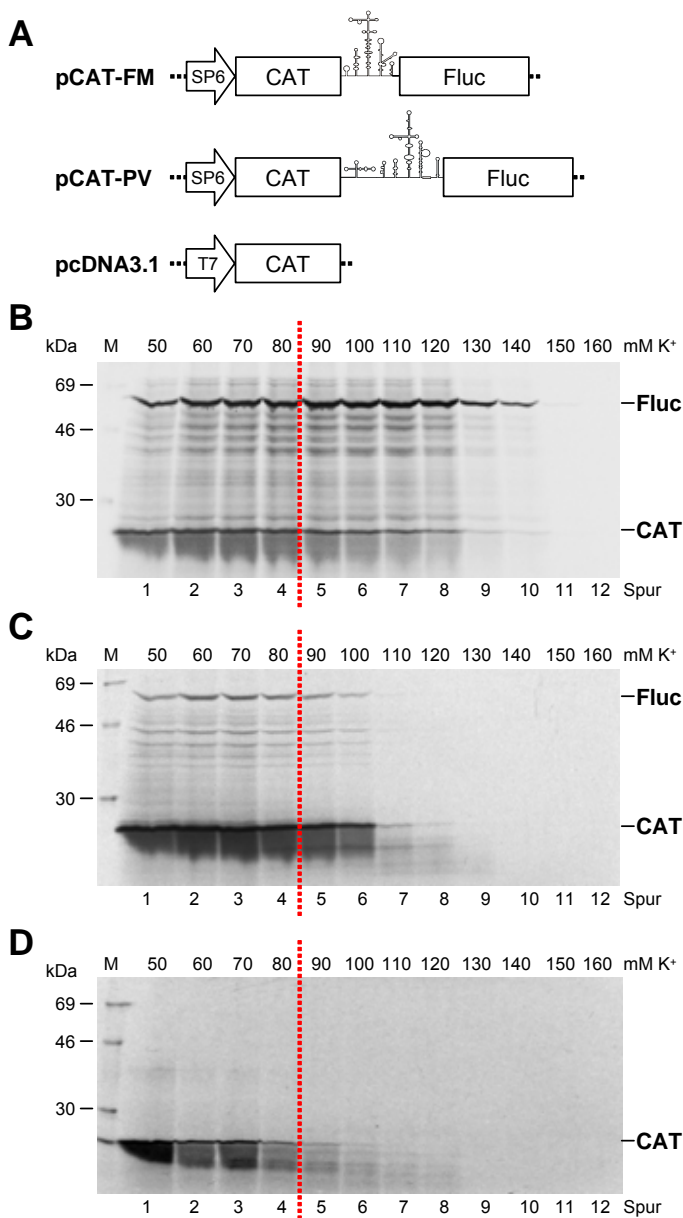
**Abb. 2.1: Einfluss der Salzkonzentration auf die Translation des ersten Reporters in einer dicistronischen RNA mit einer FMDV-IRES.**

**A)** Die dicistronische Expressionskassette mit dem SP6-Polymerase-Promoter für die *in vitro*-Transkription der RNA, dem Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) als erstem Reporter, der FMDV-IRES mit ihren fünf Stem-Loops und dem Gen für Firefly Luziferase (Fluc) als zweitem Reporter. Der Pfeil zeigt die Stelle der up-4-Mutation. **B)** Der apikale Teil des Stem-Loop 4 der FMDV-IRES mit der Mutation up-4. Die eingefügte Mutation verändert nicht nur die Sequenz, sondern auch die Sekundärstruktur des Stem-Loops. **C)** <sup>35</sup>S-markierte Proteine aus einer *in vitro*-Translation in Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL) in Anwesenheit von 50 und 120 mM Kaliumchlorid (KCl) nach Auftrennung durch SDS-PAGE. **D)** Northern Blots (Y. Song) mit re-extrahierten RNAs. **E)** Enzymatische Aktivität von CAT und Fluc nach *in vitro*-Translation wie in (C). M: Marker, wt: Wildtyp-FMDV-IRES, up-4: mutierte FMDV-IRES. Abbildung aus Jünemann et al., 2007.

Neben einer Analyse dieses Effekts mittels SDS-PAGE wurden auch enzymatische Assays zur Messung der Expression beider Reporter durchgeführt. Bei Niedrigsalzbedingungen war auch hier die Expression des zweiten Reporters bei Verwendung einer mutierten IRES deutlich niedriger, als bei Verwendung einer Wildtyp-FMDV-IRES, während die Expression des ersten Reporters CAT ungefähr gleich hoch war. Wurden diese beiden dicistronischen Konstrukte nun unter physiologischen Bedingungen *in vitro* translatiert, war die Expression des vor dem IRES-Element stromaufwärts liegenden Reporters unterschiedlich stark: Bei Verwendung einer mutierten IRES translatierte das erste Reportergen CAT nur noch etwa halb so stark wie ein CAT-Reportergen in einem Konstrukt, das eine Wildtyp-IRES beinhaltet (Abb. 2.1E).

## 2.2 Die Verstärkung der Expression des ersten Reporters ist unabhängig vom Typ der verwendeten picornaviralen IRES

Da eine effiziente Translation des ersten Reporters in dicistronischen Konstrukten mit einer FMDV-IRES beobachtet worden war, sollte im Weiteren geklärt werden, ob dieser Effekt nur durch eine FMDV-IRES bewirkt werden kann, oder ob auch ein anderes picornavirales IRES-Element einen Einfluss auf die Translation des ersten Reportergens hat. Die internen Ribosomen-Eintrittsstellen der Picornaviren werden aufgrund ihrer Primärsequenz und ihrer Sekundärstruktur in verschiedene Typen unterteilt. Während FMDV als ein Vertreter der Aphthoviren eine Typ II-IRES trägt, besitzt zum Beispiel Poliovirus (Genus Enterovirus) eine IRES des Typs I (siehe auch Kap. 1.2.2, Initiation der Translation durch eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle). Daher wurde die IRES des Poliovirus in ein dicistronisches Konstrukt (pCAT-PV) kloniert, das in 5'-3'-Richtung das Reportergen für Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), die IRES des Poliovirus (PV) und das zweite, IRES-abhängig translatierte Reportergen Firefly Luziferase (Fluc) enthält. Zusammen mit dem bereits oben beschriebenen Konstrukt pCAT-FM wurden dann weitere *in vitro*-Experimente durchgeführt.



**Abb. 2.2: Translation des ersten Reportergens CAT bei verschiedenen Salzkonzentrationen.**

**A)** Dicistronische Expressionskassetten mit dem SP6-Polymerase-Promoter für die *in vitro*-Transkription der RNA, dem Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), der Wildtyp-FMDV-IRES (pCAT-FM) oder Wildtyp-Poliovirus-IRES (pCAT-PV) und dem Gen für Firefly Luziferase (Fluc) als zweitem Reporter. Das Konstrukt pcDNA3.1 enthält einen T7-Promoter und das Reportergen CAT und wurde für die *in vitro*-Transkription monocistronischer RNA verwendet.

**B)** <sup>35</sup>S-markierte Proteine aus einer *in vitro*-Translation in Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL) mit dicistronischer pCAT-FM-RNA bei 50 bis 160 mM K<sup>+</sup> nach Auftrennung mittels SDS-PAGE. M: Marker

**C)** Wie in (B) mit dicistronischer pCAT-PV RNA.

**D)** Wie in (B) mit monocistronischer CAT-RNA.

Verändert aus Jünemann et al., 2007.

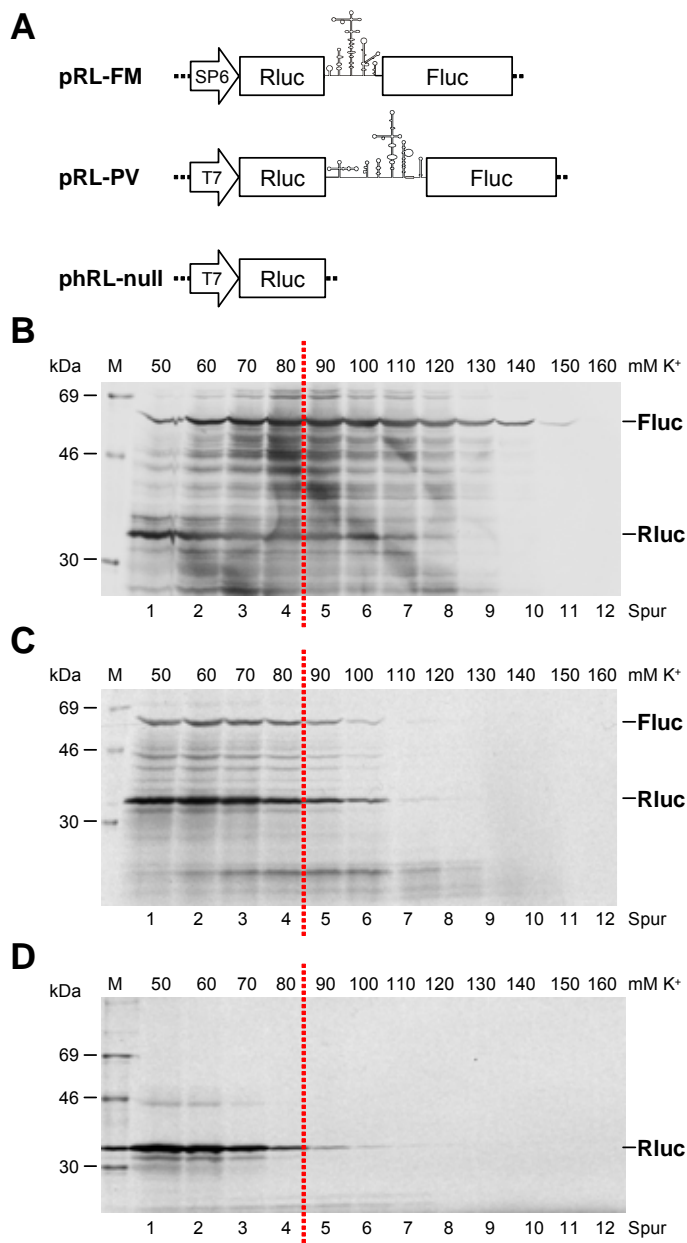
In einem ersten Experiment wurde die Translationseffizienz des Reportergens CAT bei verschiedenen Salzkonzentrationen ermittelt. Dazu wurden dicistronische Konstrukte mit einer FMDV-IRES (pCAT-FM) bzw. einer Poliovirus-IRES (pCAT-PV) in Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL) bei Salzkonzentrationen von 50 bis 160 mM  $K^+$  translatiert. Beide Konstrukte tragen ein CAT-Reportergen vor dem jeweiligen IRES-Element. Hinter dem IRES-Element folgt bei beiden Konstrukten Fluc als zweites Reportergen. Eine monocistronische RNA mit einem CAT-Reportergen diente als Kontrolle (Abb. 2.2A). Eine Analyse der Expression der Reportergene mittels SDS-PAGE zeigte, dass CAT bei Verwendung einer FMDV-IRES bis zu einer Salzkonzentration von 120 mM  $K^+$  und bei Verwendung einer Poliovirus-IRES bis zu 100 mM  $K^+$  effizient translatiert wurde (Abb. 2.2B und C). Die Expression des CAT-Gens durch eine monocistronische RNA zeigte dagegen einen starken Abfall bei Salzkonzentrationen von mehr als 80 mM  $K^+$  und war bei Konzentrationen von mehr als 100 mM  $K^+$  nicht mehr nachweisbar (Abb. 2.3D).

In dicistronischen Konstrukten mit einer picornaviralen IRES wird der erste Reporter bei physiologischen Salzkonzentrationen also effizient translatiert, wobei der Typ des verwendeten IRES-Elements diesen Effekt kaum beeinflusst. Allerdings ist die Verstärkung der Translation des ersten Reporters bei Verwendung einer Poliovirus-IRES nicht ganz so stark wie bei Verwendung einer FMDV-IRES. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das IRES-Element von Poliovirus sein Salzoptimum bei etwa 80 mM  $K^+$  hat, während das Salzoptimum einer FMDV-IRES bei etwa 120 mM  $K^+$  liegt (Borman et al., 1995, Borman et al., 1997).

### **2.3 Die Verstärkung der Expression des ersten Reporters ist unabhängig von der Art des verwendeten ersten Reportergens**

Um auszuschließen, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um ein Charakteristikum des als ersten Reporter verwendeten CAT-Gens handelte, wurden weitere dicistronische Konstrukte kloniert, die statt CAT das *Renilla* Luziferase (Rluc)-Reportergen tragen (Abb. 2.3A). Auch bei der Verwendung von Rluc als ersten Reporter in diesen dicistronischen Konstrukten war die Translationseffizienz in Anwesenheit einer funktionalen IRES im Vergleich zur Translation einer monocistronischen Rluc-RNA auch unter physiologischen Salzkonzentrationen hoch. Das Rluc-Gen in der dicistronischen RL-FM-RNA translatierte effektiv bis zu einer Salzkonzentration von 110 mM  $K^+$  (Abb. 2.3B) und in einer dicistronischen RL-PV-RNA noch bis zu 100 mM  $K^+$  (Abb. 2.3C). Auch in diesem Fall zeigt die monocistronische Kontroll-RNA eine effiziente Rluc-Expression nur bis zu einer Konzentration von 80 mM  $K^+$  (Abb. 2.3D).

Nachdem alle diese bisher beschriebenen Experimente in Kaninchen-Retikulozytenlysat durchgeführt worden sind, sollten die Ergebnisse auch in HeLa-Zellextrakt verifiziert werden. Dieser Zellextrakt erlaubt es, Translationen unter nahezu physiologischen Bedingungen durchzuführen (Bergamini et al., 2000). Bei der Verwendung des HeLa-Zellextraktes für die *in vitro*-Translationen zeigte sich, dass die Expression von Rluc von einem monocistronischen Konstrukt auch noch bei höheren Salzkonzentrationen möglich ist. Allerdings ist die Expression von Rluc von einem monocistronischen Konstrukt im Vergleich zu dicistronischen Konstrukten mit einer Picornavirus-IRES insgesamt sehr niedrig. Dicistronische RNAs waren im Gegensatz dazu in der Lage, bis zu einer Salzkonzentration von 100 bis 140 mM  $K^+$  sehr effektiv zu translatieren.



**Abb. 2.3: Translation des ersten Reportergens Rluc bei verschiedenen Salzkonzentrationen.**

**A)** Dicistronische Expressionskassetten mit dem SP6- bzw. T7-Polymerase-Promoter für die *in vitro*-Transkription der RNA, dem Gen für Rluc, der Wildtyp-FMDV-IRES (pRL-FM) oder Wildtyp-Poliovirus-IRES (pRL-PV) und dem Gen für Fluc als zweitem Reporter. Monocistronische RNA wurde von phRL-null *in vitro* transkribiert.

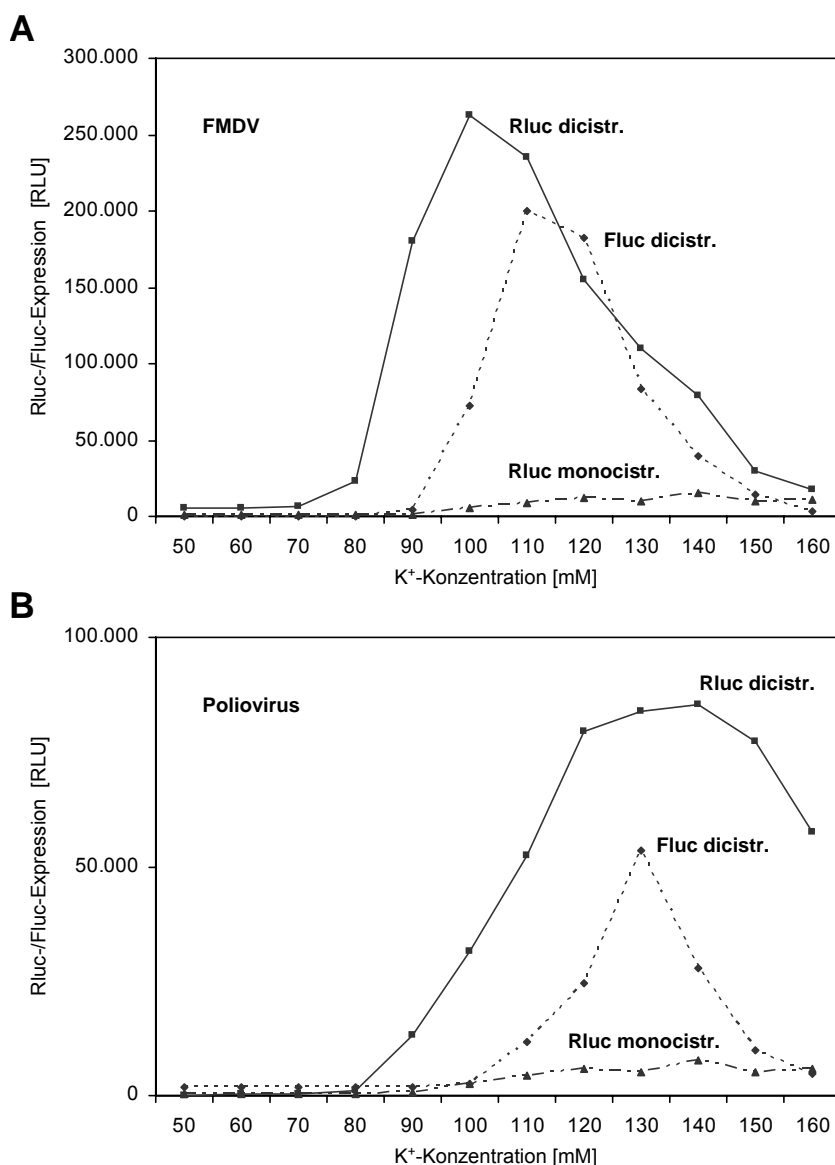
**B)**  $^{35}\text{S}$ -markierte Proteine aus einer *in vitro*-Translation in Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL) mit dicistronischer pRL-FM RNA bei 50 bis 160 mM  $\text{K}^+$  nach Auftrennung mittels SDS-PAGE. M: Marker

**C)** Wie in (B) mit dicistronischer pRL-PV-RNA.

**D)** Wie in (B) mit monocistronischer Rluc-RNA.

Verändert aus Jünemann et al., 2007.

Bei Verwendung einer dicistronischen RNA mit einer FMDV-IRES ist die Expression des ersten Reportergens Rluc bei 100 mM  $\text{K}^+$  am höchsten und fällt dann langsam ab (Abb. 2.4A). Rluc ist aber deutlich detektierbar bis zu einer Salzkonzentration von 140 mM  $\text{K}^+$ . Die Expression des zweiten Reportergens Fluc korreliert mit den Rluc-Werten, hier liegt das Salzoptimum für die Expression bei 110 mM  $\text{K}^+$ , und die Expression ist bis 140 mM  $\text{K}^+$  gut detektierbar. Auch mit der Poliovirus-IRES in einem dicistronischen Konstrukt war die Expression von Rluc im Vergleich zu der Expression von Rluc von einer monocistronischen RNA sehr viel höher (Abb. 2.4B).



**Abb. 2.4: Translation der Reportergene bei Salzkonzentrationen von 50 bis 160 mM K<sup>+</sup> in HeLa-Zellextrakt.**

**A)** *In vitro*-Translation dicistronischer RNA mit einer Wildtyp-FMDV-IRES. Durchgezogene Linie: Aktivität des ersten Reporters Rluc nach Expression der dicistronischen RL-FM RNA; gestrichelte Linie: Aktivität des zweiten Reporters nach Expression von pRL-FM; Strich-Punkt-Linie: Expression von Rluc nach *in vitro*-Translation einer monocistronischen RNA (phRL-null).

**B)** *In vitro*-Translation dicistronischer RNA mit der Wildtyp-FMDV-IRES. Linien wie in (A).

Die Daten stellen Mittelwerte aus fünf Experimenten dar.

RLU: relative Lichteinheiten (relative light units).

Verändert aus Jünemann et al., 2007.

Diese Ergebnisse belegten noch einmal, dass die Expression des ersten Reporters in dicistronischen Konstrukten durch die Anwesenheit einer picornaviralen IRES stimuliert werden kann. Diese Stimulation ist unabhängig von der Art der verwendeten IRES, da sie sowohl für FMDV-IRES als auch für Poliovirus-IRES gezeigt werden konnte und diese beiden IRES-Elemente unterschiedlichen Typen von internen Ribosomen-Eintrittsstellen zugeordnet werden. Auch ist sie unabhängig von der Art des verwendeten ersten Reportergens, da eine Stimulation der Translation sowohl für CAT als auch für Rluc als ersten Reporter gezeigt werden konnte.

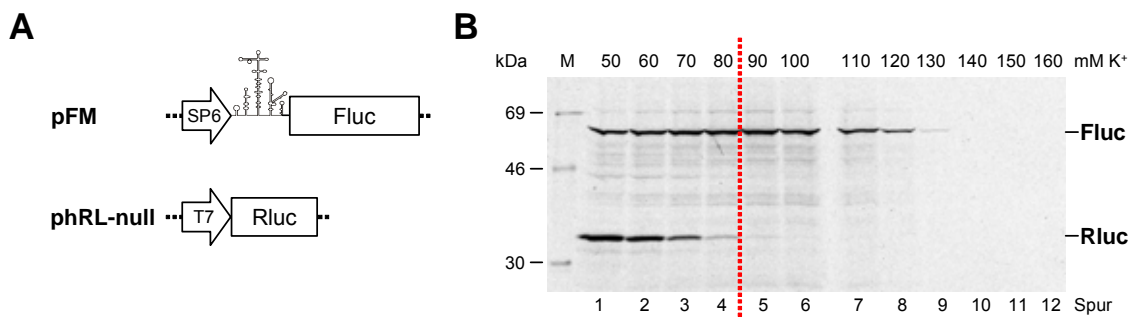
In einem nächsten Schritt sollte nun geklärt werden, ob die Stimulation der Translation *in cis* auf dem gleichen RNA-Molekül geschieht, oder ob der Effekt auch *in trans* von einer RNA zu einer anderen RNA vermittelt werden kann.



## 2.4 Die Stimulation der Translation des ersten Reporters erfolgt in *cis*

Da die Stimulierung des stromaufwärts der IRES gelegenen Reportergens in dicistronischen RNAs beobachtet wurde, ließ dies vermuten, dass der Effekt in *cis* auftritt. Um zu zeigen, dass dieser Effekt tatsächlich in *cis* und nicht in *trans* auftritt, wurden *in vitro*-Translationen mit verschiedenen Salzkonzentrationen durchgeführt, bei denen die beiden Reportergene auf zwei verschiedenen RNAs lokalisiert waren. Das Konstrukt pFM enthält in 5'-3'-Richtung einen SP6-Polymerase-Promoter, gefolgt von der FMDV-IRES und dem Reportergen für Fluc. phRL-null kodiert für Rluc (Abb. 2.5A). Von diesen beiden Konstrukten wurden RNAs *in vitro* transkribiert und zusammen bei verschiedenen Salzkonzentrationen in Kaninchen-Retikulozytenlysat *in vitro* translatiert.

Während das Firefly-Reportergen unter der Kontrolle der FMDV-IRES bis zu Salzkonzentrationen von 120 mM K<sup>+</sup> effektiv translatiert wurde, war die Expression von Rluc nur bis zu einer K<sup>+</sup>-Konzentration von 50 bis 70 mM relativ gut und ging bei Konzentrationen ab 80 mM K<sup>+</sup> stark zurück (Abb. 2.5B). War das Rluc-Reportergen im Gegensatz dazu als erstes Cistron in einer dicistronischen RNA vorhanden, war die Renilla-Expression bis zu 100 mM K<sup>+</sup> und höher nachweisbar (Abb. 2.3B und C). Die Expressionsverstärkung des ersten Reporters ist also ein Effekt, der in *cis* auf derselben RNA und nicht in *trans* auftritt.



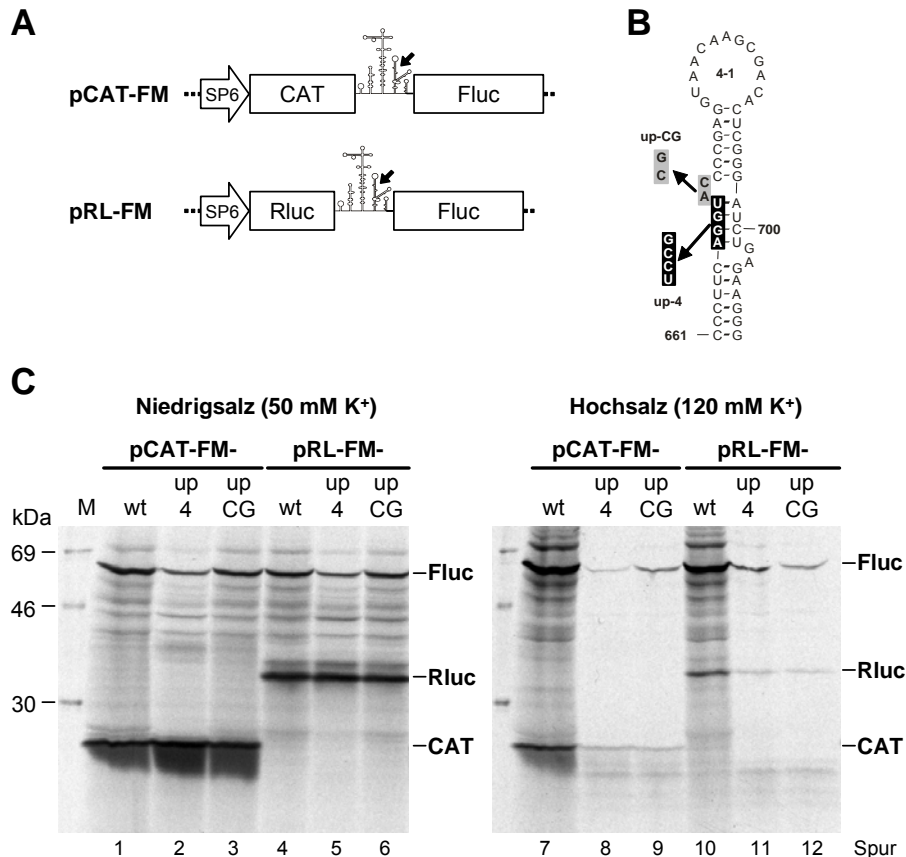
**Abb. 2.5: Die Verstärkung der Expression des ersten Reporters ist ein Effekt, der nicht in *trans* auftritt.** A) *In vitro*-Transkription einer monocistronischen RNA mit der Wildtyp-FMDV-IRES, gefolgt von dem Gen für Fluc, erfolgte von Plasmid pFM; die RNA für Rluc wurde von Plasmid phRL-null *in vitro*-transkribiert. B) <sup>35</sup>S-markierte Proteine aus einer *in vitro*-Translation der beiden RNAs in RRL mit steigender Konzentration an K<sup>+</sup> nach Auftrennung mittels SDS-PAGE. M: Marker. Verändert aus Jünemann et al., 2007.

## 2.5 Die Stimulation der Translation des ersten Reporters korreliert mit der Funktionalität der IRES

Bei den bisher verwendeten IRES-Elementen handelt es sich entweder um eine Wildtyp-IRES, die voll funktionsfähig ist, oder aber um eine mutierte IRES, die ihre Fähigkeit zur Initiation der Translation des zweiten Reportergens fast vollständig verloren hat. Um zu zeigen, dass die Translationsverstärkung mit der Funktionalität des verwendeten picornaviralen IRES-Elements zusammenhängt, wurden weitere Experimente mit Wildtyp- und mutierten FMDV- oder Poliovirus-IRES-Elementen durchgeführt.

Die verwendeten Konstrukte pCAT-FM und pRL-FM tragen in 5'-3'-Richtung einen SP6-Polymerase-Promoter, das Reportergen CAT beziehungsweise Rluc, eine FMDV-IRES und als zweiten Reporter Fluc (Abb. 2.6A). Als interne Ribosomen-Eintrittsstelle wurde entweder die Wildtyp-IRES (wt) von FMDV verwendet, die bereits oben genannte Mutation up-4 oder die Mutante up-CG, die beide im Stem-Loop 4 der FMDV-IRES mutiert wurden. Bei der up-4-Mutation wird durch den Austausch von

vier Nukleotiden (AGGU zu UCCG) die Basenpaarung an dieser Stelle aufgehoben und so nicht nur die Sequenz, sondern auch die Struktur der FMDV-IRES verändert. Bei der Mutation up-CG ändert sich durch den Austausch der beiden Nukleotide AC zu CG dagegen die Sequenz, nicht jedoch die Struktur der FMDV-IRES (Abb. 2.6B). Bei beiden Mutationen ist die Fähigkeit, Initiationsfaktoren zu binden, eingeschränkt. Dicistronische Konstrukte mit entweder der Wildtyp-FMDV-IRES oder einer der beiden Mutationen wurden in *in vitro*-Translationen in RRL eingesetzt.



**Abb. 2.6: Einfluss von Wildtyp- und mutierter FMDV-IRES auf die Translation des ersten Reporters.**

**A)** Die dicistronische Expressionskassette mit dem SP6-Polymerase-Promoter für die *in vitro*-Transkription der RNA, dem Gen für CAT oder RLuc als erstem Reporter, der FMDV-IRES mit ihren fünf Stem-Loops und dem Gen für Fluc als zweitem Reporter. Der Pfeil zeigt die Stelle der Mutationen (up-4 und up-CG) in der FMDV-IRES.

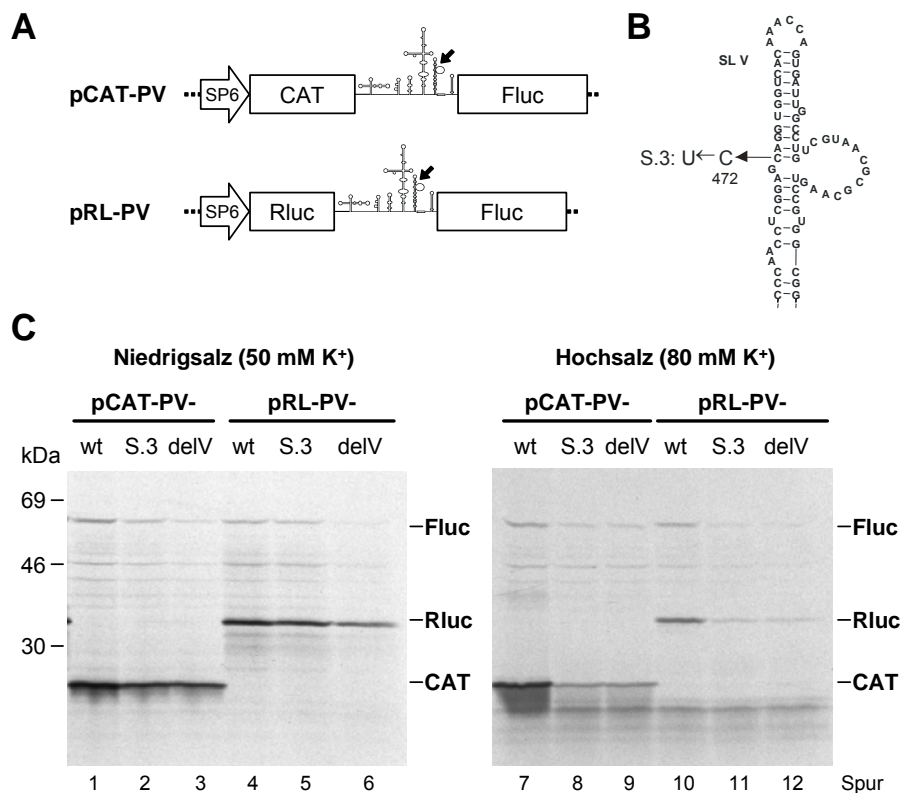
**B)** Der apikale Teil des Stem-Loop 4 der FMDV-IRES mit den Mutationen up-4 und up-CG.

**C)** <sup>35</sup>S-markierte Proteine nach *in vitro*-Translation dicistronischer Konstrukte unter Niedrigsalzbedingungen (links) und unter Hochsalzbedingungen (rechte Seite). M: Marker, wt: Wildtyp, up-4 und up-CG: mutiertes FMDV-IRES-Element. Verändert aus Jünemann et al., 2007.

Wie schon bei den ersten Experimenten gezeigt (Abb. 2.1C), war die Expression des ersten Reporters in einer dicistronischen RNA unter Niedrigsalzbedingungen (50 mM K<sup>+</sup>) sowohl bei Verwendung einer Wildtyp-FMDV-IRES als auch bei Verwendung eines mutierten FMDV-IRES-Elements hoch. Im Gegensatz dazu zeigte die Expression des zweiten Reporters Fluc die Unterschiede in der Funktionalität der FMDV-IRES bereits bei Niedrigsalz deutlich: Während die Expression von Fluc bei der Wildtyp-FMDV-IRES hoch ist, ist sie bei den beiden Mutationen up-4 und up-CG nicht so stark. Allerdings translatiert das dicistronische Konstrukt mit der FMDV-IRES-Mutation up-CG das Reportergen Firefly Luziferase etwas besser als die Mutation up-4, die in ihrer Funktionalität in Bezug auf die Bindung von Initiationsfaktoren stärker eingeschränkt ist (Abb. 2.6C, Spuren 1 bis 6). Bei einer physiologischen Salzkonzentration von 120 mM K<sup>+</sup> ist auch die Expression des ersten Reporters bei Verwendung von mutierten IRES-Elementen deutlich geringer als bei der Verwendung einer Wildtyp-FMDV-IRES. Sowohl die up-4- als auch die up-CG-Mutante der FMDV-IRES beeinflussen also unter physiologischen Bedingungen die Expression des ersten Reporters. Dabei ist die Natur des

ersten Reporters unerheblich, da sich dies sowohl bei Benutzung von CAT als auch bei Rluc als erstem Reporter feststellen lässt (Abb. 2.6C, Spuren 7 bis 12).

Neben den Mutationen der FMDV-IRES wurden auch dicistronische Konstrukte mit einer Poliovirus-IRES zwischen den beiden Reportergen in *in vitro*-Translationen in RRL verwendet. Bei der Poliovirus-IRES handelte es sich entweder um die Wildtyp-IRES (wt) oder ein mutiertes IRES-Element. Bei der Punktmutation S.3 wurde ein Nukleotid von C nach U getauscht (Abb 2.7B). Bei dieser Mutation kommt es zu keiner Änderung in der Sekundärstruktur der Poliovirus-IRES, da ein U-G-Basenpaar die C-G-Basenpaarung ersetzen kann. Bei der Mutation delV wurde der komplette Stem-Loop V, der die Bindungsstellen für die eukaryotischen Initiationsfaktoren trägt (Ochs et al., 2003), entfernt.



**Abb. 2.7: Einfluss von Wildtyp- und mutierter Poliovirus-IRES auf die Translation des ersten Reporters.**

**A)** Dicistronische Expressionskassetten mit dem SP6-Polymerase-Promoter für die *in vitro*-Transkription der RNA, dem Gen für CAT oder Rluc als erstem Reporter, der PV-IRES und dem Gen für Fluc als zweitem Reporter. Der Pfeil zeigt die Stelle der S.3-Mutation, bei der ein Nukleotid an Position 472 von einem C zu einem U mutiert wurde. In der Mutation delV fehlt der komplette Stem-Loop V der Poliovirus-IRES.

**B)** Der apikale Teil des Stem-Loop V der PV-IRES mit der Mutation S.3.

**C)** <sup>35</sup>S-markierte Proteine aus einer *in vitro*-Translation in RRL mit 50 und 80 mM K<sup>+</sup> nach Auftrennung mittels SDS-PAGE.

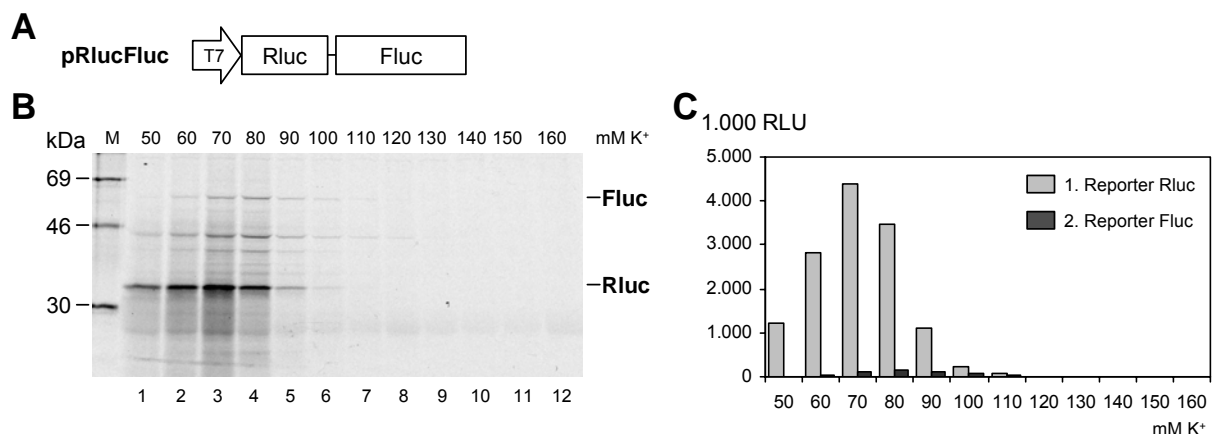
M: Marker, wt: Wildtyp, S.3/delV: mutiertes Poliovirus-IRES-Element.

Verändert aus Jünemann et al., 2007.

Alle in diesem Experiment verwendeten Reporterkonstrukte tragen entweder CAT (pCAT-PV) oder Rluc (pRL-PV) als ersten Reporter, gefolgt von der Poliovirus-IRES und dem zweiten Reporter Fluc. Wurden diese sechs verschiedenen dicistronischen RNAs bei einer K<sup>+</sup>-Konzentration von 50 mM in RRL translatiert, so war die Expression des ersten Reporters sowohl bei Verwendung der Wildtyp-IRES als auch bei Verwendung eines mutierten IRES-Elements relativ hoch. Die Expression des zweiten Reporters Fluc zeigte allerdings bereits bei Niedrigsalz deutliche Unterschiede: Während eine Wildtyp-PV-IRES Fluc gut translatierte, war die Expression des zweiten Reporters durch ein mutiertes IRES-Element sehr viel schlechter. Dabei waren außerdem auch Unterschiede zwischen der Deletionsmutante delV und der Punktmutation S.3 festzustellen, wobei die Fluc-Expression bei dicistronischen Konstrukten mit delV nochmals deutlich schlechter war.

Für *in vitro*-Translationen der dicistronischen Poliovirus-Konstrukte unter "physiologischen Salzbedingungen" wurden  $K^+$ -Konzentrationen von 80 mM gewählt, da von Borman und Koautoren gezeigt worden war, dass Poliovirus sein Optimum bei 80 mM  $K^+$  hat (Borman et al., 1995, Borman et al., 1997). Bei Benutzung der Wildtyp-Poliovirus-IRES zusammen mit den mutierten IRES-Elementen zeigte sich, dass die Mutationen nicht nur die Expression des zweiten Reporters Fluc, sondern auch die Expression des ersten Reporters beeinflussen. Während eine Wildtyp-IRES von Poliovirus auch unter höheren Salzbedingungen in der Lage war, dass erste Reportergen effizient zu translatieren, war die Expression des ersten Reporters bei Benutzung eines mutierten IRES-Elements deutlich schwächer. Dabei war, wie schon bei der FMDV-IRES, die Natur des ersten Reporters unerheblich, da der Effekt sowohl bei CAT als auch bei Rluc als erstem Reporter beobachtet werden konnte (Abb. 2.7C).

Die Funktionalität des verwendeten picornaviralen IRES-Elements scheint also der entscheidende Parameter für die Stimulation der Translation des ersten Reporters unter physiologischen Bedingungen zu sein. Diese Hypothese wurde durch ein weiteres Experiment untersucht, bei dem eine RNA verwendet wurde, bei der die Picornavirus-IRES entfernt wurde und so die beiden Reportergene für Rluc und Fluc direkt aufeinander folgen (Abb. 2.8A). Diese RNA wurde in *in vitro*-Translationen mit steigender Salzkonzentration von 50 bis 160 mM  $K^+$  eingesetzt.



**Abb. 2.8: Wirkung eines picornavirales IRES-Elements auf die Verstärkung der Translation des ersten Reporters.**

A) In pRlucFluc folgen nach dem T7-Promoter direkt die Reportergene für Rluc und Fluc. B)  $^{35}S$ -markierte Proteine nach *in vitro*-Translation mit RlucFluc-RNA in RRL bei 50 bis 160 mM  $K^+$  nach Auftrennung mittels SDS-PAGE. C) Enzymatische Aktivität der beiden Reportergene wie in (B) in Tausend RLU. RLU: Relative Lichteinheiten (relative light units).

Abb. 2.8B zeigt  $^{35}S$ -markierte Proteine nach einer *in vitro*-Translation von Rluc-Fluc RNA in RRL bei Salzkonzentrationen von 50 bis 160 mM  $K^+$  nach Auftrennung mittels SDS-PAGE. Die Expression des ersten Reporters Rluc erreicht ein Maximum bei 70 mM  $K^+$  und ist bei Salzkonzentrationen höher 100 mM  $K^+$  praktisch nicht mehr sichtbar. In einem weiteren Experiment wurde die Menge beider Reportergene mittels Reporter-Assays enzymatisch bestimmt. Auch hier erreichte die Expression von Rluc ein Maximum bei 70 mM  $K^+$  und war bei 100 mM  $K^+$  fast nicht mehr detektierbar (Abb. 2.8C). Die Expression des zweiten, direkt auf Rluc folgenden Reportergens Fluc war in allen Versuchen im Vergleich zur Expression des ersten Reportergens sehr schwach.

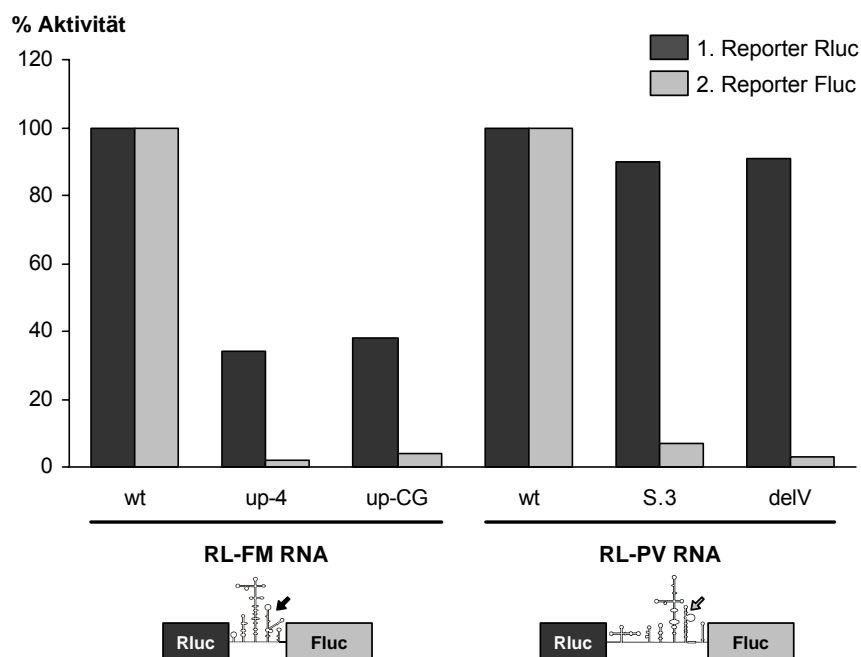
Von einer RNA mit zwei direkt hintereinander folgenden Reportergenen wird also in diesem Fall nur das erste überhaupt translatiert und dies auch nur bis zu einer Salzkonzentration von etwa 80 mM  $K^+$ . Eine solche RNA ist in ihrer Translationseffizienz daher mit einer monocistronischen RNA (Abb. 2.3D) vergleichbar.

Werden also in einer dicistronischen RNA picornvirale Wildtyp-IRES-Elemente verwendet, so wird die Translation des ersten Reporters unter physiologischen Salzbedingungen stimuliert. Ein IRES-Element mit einer Mutation in der Bindungsstelle für Translationsinitiationsfaktoren ist dazu nicht mehr in der Lage. Alle bisher *in vitro* durchgeführten Experimente lassen demzufolge den Schluss zu, dass nur eine funktionale interne Ribosomen-Eintrittsstelle in der Lage ist, die Translation des ersten Reporters zu stimulieren.

## 2.6 Stimulation der Translation *in vivo*

Um zu zeigen, dass eine Verstärkung der Translation des ersten Reporters auch unter physiologischen Bedingungen in lebenden Zellen auftritt, wurden dicistronische RNAs in eukaryotische Zellen transfiziert. Dafür wurden dicistronische RNAs mit FMDV- oder Poliovirus-IRES verwendet, die als ersten Reporter CAT beziehungsweise Rluc und als zweites Reportergen Fluc haben. Für die Transfektion der FMDV-Konstrukte wurden BHK21-Zellen verwendet, da FMDV effizient in diesen Zellen repliziert (Sangar et al., 1977), während für Poliovirus HeLa-Zellen verwendet wurden, da diese die Replikation von Poliovirus unterstützen (Dildine et al., 1991, Molla et al., 1991, Pelletier et al., 1988).

Nach Transfektion unprozessierter RNAs zeigte sich, dass die Expression des ersten Reportergens Rluc von einer dicistronischen RNA mit einer aktiven IRES höher ist als bei der Verwendung von mutierten IRES-Elementen (Abb. 2.9). Die Verstärkung der Expression von Rluc korrelierte dabei mit den Resultaten aus den *in vitro*-Experimenten. Während die Translation in Gegenwart einer aktiven FMDV-IRES 2- bis 3,5-mal so hoch war wie in Anwesenheit einer mutierten und damit inaktiven IRES (Abb. 2.9, linke Seite), war die Translationsverstärkung bei Verwendung eines aktiven Poliovirus-IRES-Elements nur gering (Abb. 2.9, rechte Seite).



**Abb. 2.9: Transfektion unprozessierter dicistronischer RNA in eukaryotische Zellen.**

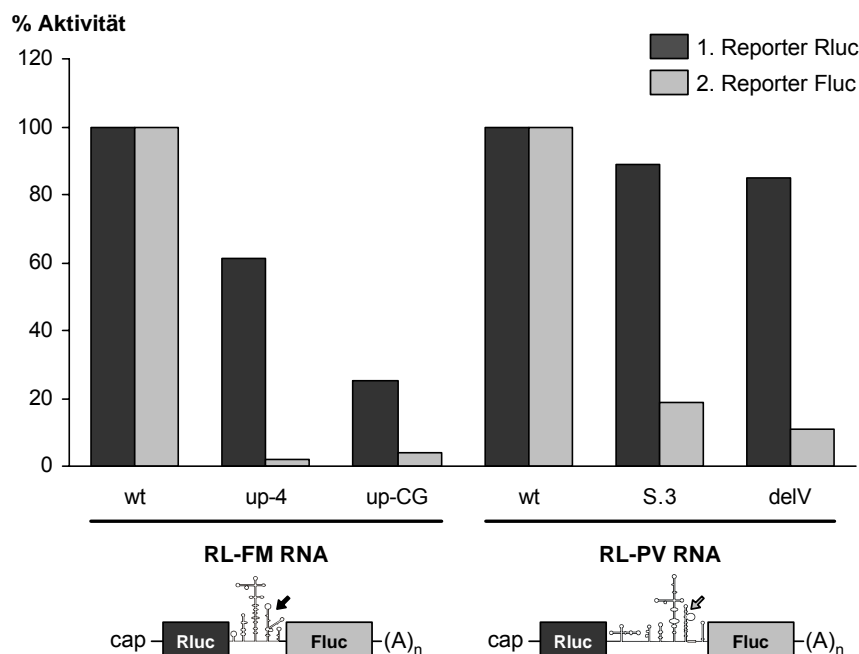
Die Expression des ersten Reporters Rluc (schwarze Säulen) und des zweiten Reporters Fluc (graue Säulen) vier Stunden nach Transfektion unprozessierter dicistronischer RNAs mit FMDV-IRES (linke Seite) und PV-IRES (rechte Seite) in eukaryotische Zellen. Daten aus zehn (FMDV) bzw. acht (PV) Experimenten.

wt: Wildtyp-IRES, up-4/up-CG: mutierte FMDV-IRES, S.3/delV: mutierte Poliovirus-IRES.

Dies bestätigt die Beobachtungen aus den *in vitro*-Experimenten, die bereits gezeigt haben, dass eine Poliovirus-IRES die Translation des stromaufwärts gelegenen Reporters nicht in dem Maße

stimulieren kann, wie eine FMDV-IRES es bewirken kann. Der Grund für diese geringere Stimulation der Translation des ersten Reporters durch die Poliovirus-IRES im Vergleich zur FMDV-IRES liegt wahrscheinlich darin, dass die Poliovirus-IRES ein Salzoptimum bei etwa 80 mM  $K^+$  hat, während FMDV optimal bei 120 mM  $K^+$  translatiert (Borman et al., 1995, Borman et al., 1997). Da die in lebenden Zellen herrschenden Salzkonzentrationen von etwa 130 mM  $K^+$  für die von einer Poliovirus-IRES gesteuerte Translation nicht optimal sind, kann eine Poliovirus-IRES auch die Translation nicht in dem Maß steigern, wie es eine FMDV-IRES vermag.

Um die Beschaffenheit zellulärer mRNAs nachzuahmen, wurden auch prozessierte RNAs verwendet. Dazu wurden die bereits oben beschriebenen dicistronischen RNAs *in vitro* in Anwesenheit von Cap-Nukleotid ( $m^7GpppG$ ) transkribiert und in einer weiteren Reaktion mit einem Poly(A)-Schwanz versehen. Diese so modifizierten RNAs wurden in Transfektionsexperimenten eingesetzt und zeigten, wie bereits zuvor die unprozessierten dicistronischen RNAs, deutlich eine Stimulation der Translation des ersten Reporters bei Verwendung eines funktionalen IRES-Elements (Abb. 2.10).



**Abb. 2.10: Transfektion dicistronischer gecappter und polyadenylierter RNA in eukaryotische Zellen.**

Expression des ersten Reporters Rluc (schwarze Säulen) und des zweiten Reporters Fluc (graue Säulen) vier Stunden nach Transfektion der RNAs mit FMDV-IRES (linke Seite) und Poliovirus-IRES (rechte Seite) in eukaryotische Zellen. Daten aus sechs (FMDV) bzw. neun (PV) Experimenten.

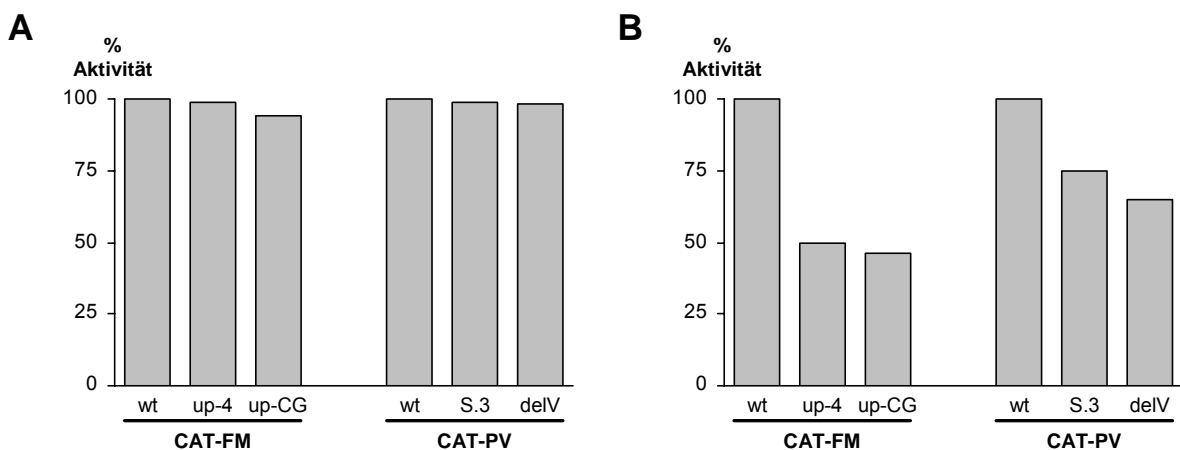
wt: Wildtyp-IRES, up-4/up-CG: mutierte FMDV-IRES, S.3/delV: mutierte Poliovirus-IRES, cap: Cap-Nukleotid,  $(A)_n$ : Poly(A)-Schwanz.

Die Translation des ersten Reporters in Anwesenheit einer aktiven IRES war hoch und sank bei Verwendung eines mutierten IRES-Elements. Gleichwohl war der Effekt bei Verwendung einer aktiven FMDV-IRES deutlich stärker als bei dicistronischen RNAs mit einer Poliovirus-IRES. Die geringere Aktivität der Poliovirus-IRES zeigt sich also auch bei der Transfektion gecappter, polyadenylierter dicistronischer RNAs.

Sowohl bei der Verwendung unprozessierter RNA als auch bei der Verwendung gecappter, polyadenylierter RNA ist die Expression des zweiten Reportergens Fluc ein gutes Maß für die Aktivität des jeweiligen IRES-Elements: Bei den beiden Deletionsmutanten FM-up-4 und PV-delV ist die Fluc-Expression deutlich niedriger als bei Verwendung der Punktmutationen FM-up-CG und PV-S.3.

### Exkurs: Schwierigkeiten bei der Messung der Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase

Während die Messung der Expression von *Renilla* und Firefly Luziferase problemlos möglich war, lieferte der verwendete CAT-Assay sowohl bei Verwendung einer Wildtyp-IRES als auch bei Verwendung von mutierten IRES-Elementen und auch bei nicht-transfizierten Zellen ähnlich hohe Werte (Abb. 2.11A). Da allerdings aus den *in vitro*-Experimenten der Einfluss eines aktiven IRES-Elementes auch auf die Translation von CAT als erstem Reporter klar zu erkennen war, schien es sich um ein methodisches Problem zu handeln. Dieses Problem konnte durch Umstellung auf einen anderen Lyse-Puffer gelöst werden. Wurden die Zellen mit dem von der Firma Promega angebotenen "Passive Lysis Buffer" lysiert, waren die für CAT ermittelten Werte bei transfizierten Zellen und bei Kontrollzellen, in die keine RNA transfiziert wurde, ähnlich hoch. Nach der Umstellung auf einen anderen Lyse-Puffer ("Reporter Lysis Buffer" von Promega) konnten plausible Werte für die Expression von CAT ermittelt werden (Abb. 2.11B). Über die Ursachen für dieses Problem kann nur spekuliert werden, da von Seiten der Firma Promega keine Angaben über die Zusammensetzung der jeweiligen Lyse-Puffer gemacht werden. Allerdings erscheint es wahrscheinlich, dass ein dem PLB zugesetztes Detergenz den CAT-Assay störte.



**Abb. 2.11: Expression des ersten Reporters CAT** vier Stunden nach Transfektion unprozessierter dicistronischer RNAs mit FMDV-IRES und Poliovirus-IRES in eukaryotische Zellen.

A) Nach Lyse der Zellen durch "Passive Lysis Buffer" (Promega) wurden für alle Konstrukte ähnliche Werte ermittelt.

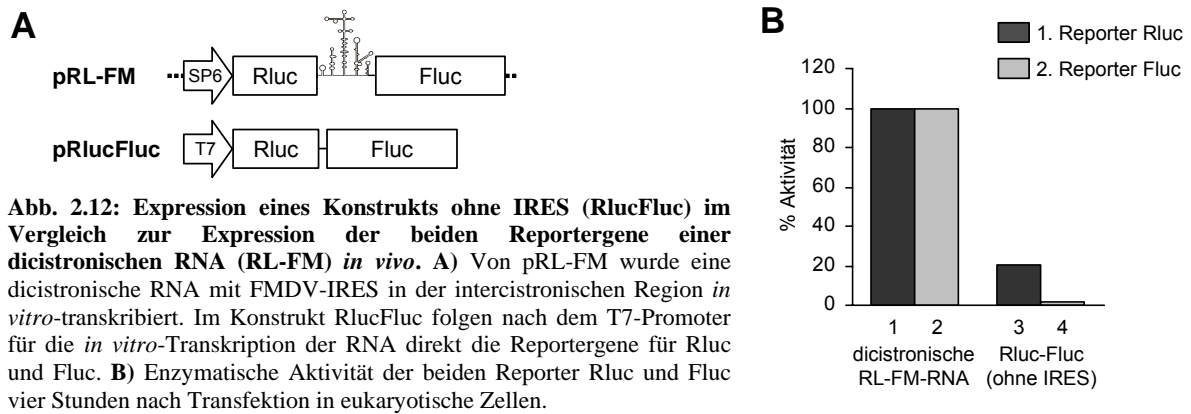
B) Messung der Expression von CAT nach Umstellung auf einen anderen Lyse-Puffer ("Reporter Lysis Buffer", Promega).

wt: Wildtyp-IRES, up-4/up-CG: mutierte FMDV-IRES, S.3/delV: mutierte Poliovirus-IRES.

Nachdem die vorgenannten Probleme gelöst waren, konnte auch die Expression des ersten Reporters CAT gemessen werden. Auch diese Ergebnisse zeigen die Verstärkung der Translation von CAT bei Verwendung eines aktiven IRES-Elements in dicistronischen RNAs (Abb. 2.11B). Wie bereits bei Rluc als erstem Reporter, war dieser Effekt bei FMDV sehr viel deutlicher als bei Verwendung einer Poliovirus-IRES.

In einem weiteren Experiment wurde eine dicistronische RNA mit Rluc als erstem Reporter, gefolgt von einer FMDV-IRES und dem zweiten Reportergen Fluc in HeLa-Zellen transfiziert. In einem Kontrollexperiment wurde eine RNA benutzt, aus deren intercistronischer Region die IRES entfernt wurde (Abb. 2.12A).

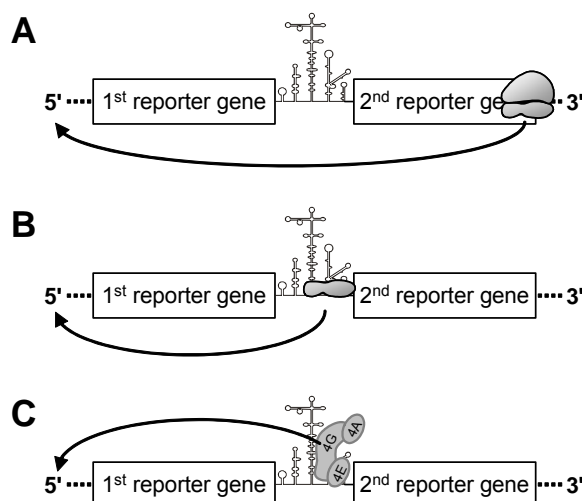




Der direkte Vergleich der Expression des ersten Reportergens Rluc zeigt den Effekt eines aktiven IRES-Elements deutlich: Während eine dicistronische RNA ohne IRES-Element zwischen beiden Reportergenen *Renilla* Luziferase nur in geringem Maße exprimiert, verstärkt eine aktive IRES die Translation des ersten Reporters Rluc um das 4- bis 5-fache auch *in vivo* (Abb. 2.12B, vergl. Spur 3 mit Spur 1).

## 2.7 Die Translation des zweiten Reporters ist für die Verstärkung der Translation durch ein IRES-Element nicht notwendig

Für die in den dicistronischen RNAs mit einer picornaviralen IRES beobachtete Stimulation der Translation des ersten Reportergens gab es zu diesem Zeitpunkt mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Es könnte sich entweder um eine Weitergabe von Ribosomen vom 3'- an das 5'-Ende der RNA handeln, eine aktive IRES könnte die kleine ribosomale Untereinheit nach ihrer Bindung auch an das 5'-Ende einer dicistronischen RNA weitergegeben oder aber es handelt sich um eine Weitergabe von Initiationsfaktoren an das 5'-Ende der RNA durch ein funktionales IRES-Element (Abb. 2.13).



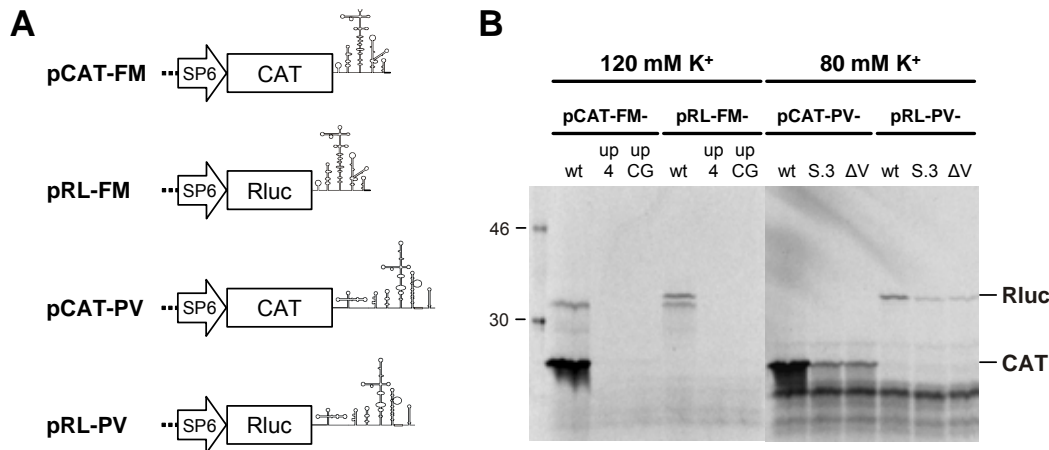
**Abb. 2.13: Für die Stimulation der Translation des ersten Reporters sind drei Erklärungen möglich.**

- A) Vom 3'-Ende der RNA wird das Ribosom an das 5'-Ende der dicistronischen RNA weitergegeben.  
 B) Ein aktives IRES-Element gibt die kleine ribosomale Untereinheit auch an das 5'-Ende der RNA weiter.  
 C) Ein aktives IRES-Element gibt den Initiationskomplex eIF4F an das 5'-Ende der RNA weiter.

Falls die Stimulation der Translation des ersten Reporters durch eine effizientere Wiederbenutzung der Ribosomen ausgelöst wird, so sollte dieser Effekt nicht mehr auftreten, wenn den für die *in vitro*-Translation verwendeten RNAs das zweite, hinter der IRES gelegene Reportergen fehlt. Zu diesem



Zweck wurden von den bereits oben verwendeten dicistronischen Reporterkonstrukten mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) Templates für die *in vitro*-Transkription hergestellt. Diese beinhalteten das erste Reportergen CAT oder Rluc und ein IRES-Element, nicht aber das zweite Reportergen für Fluc (Abb. 2.14A).



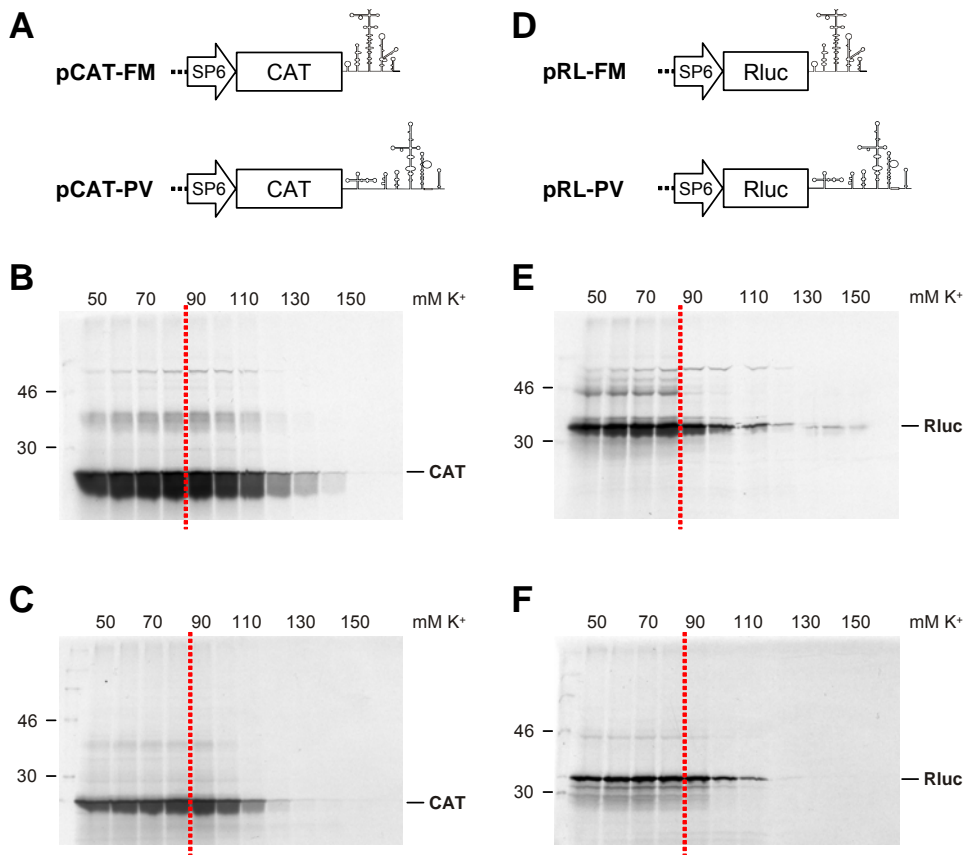
**Abb. 2.14: Einfluss der Translation des zweiten Reporters auf die Stimulation der Translation des ersten Reporters durch IRES-Elemente bei 120 mM K<sup>+</sup> (FMDV) bzw. 80 mM K<sup>+</sup> (Poliovirus). A)** Schema der PCR-Fragmente für die *in vitro*-Transkription der RNAs ohne den zweiten Reporter Fluc. **B)** <sup>35</sup>S-markierte Proteine aus einer *in vitro*-Translation in RRL mit 120 (FMDV) und 80 (PV) mM K<sup>+</sup>. wt: Wildtyp-IRES, up-4/up-CG: mutierte FMDV-IRES, S.3/delV: mutierte Poliovirus-IRES. Verändert aus Jünemann et al., 2007.

In einem ersten Experiment wurden dicistronische FMDV-Konstrukte mit CAT beziehungsweise Rluc als erstem Reportergen bei 120 mM K<sup>+</sup> *in vitro* translatiert (Abb. 2.14B, linke Seite). Sowohl CAT als auch Rluc wurden effizient translatiert, wenn eine Wildtyp-FMDV-IRES stromabwärts des entsprechenden Reportergens vorhanden war. Im Gegensatz dazu wurde bei Benutzung eines mutierten IRES-Elements der erste Reporter fast gar nicht translatiert. Dieses Ergebnis stimmt mit den vorherigen Experimenten überein, mit denen gezeigt werden konnte, dass die Expression des ersten Reporters Rluc mit monocistronischen RNAs nur bei Konzentrationen bis 80 mM K<sup>+</sup> nachweisbar ist (Abb. 2.3D), während dicistronische Konstrukte mit einer funktionalen FMDV-IRES CAT und Rluc effizient bis zu einer Konzentration von 120 mM K<sup>+</sup> translatieren (Abb. 2.3B, C). Ähnliche Resultate wurden auch mit einer Poliovirus-IRES stromabwärts des ersten Reporters erzielt, allerdings war hier die Rluc Expression etwas niedriger als die Expression des ersten Reporters CAT (Abb. 2.14B, rechte Seite).

Die von PCR-Fragmenten transkribierten RNAs, denen der zweite Reporter fehlte, wurden auch in Kaninchen-Retikulozytenlysat mit steigenden Salzkonzentrationen translatiert (Abb. 2.15). Bei diesem Versuch wurden nur die Konstrukte verwendet, die eine Wildtyp-IRES aufweisen.

Dabei konnten ähnliche Ergebnisse wie bei der Verwendung dicistronischer RNAs erzielt werden. Die Verwendung einer aktiven FMDV-IRES führt zu einer Stimulation der Translation des ersten Reporters CAT, der noch bei 120 mM K<sup>+</sup> gut translatiert (Abb. 2.15B). Auch bei Verwendung einer aktiven Poliovirus-IRES ist die Expression von CAT bis 110 mM K<sup>+</sup> erhöht (Abb. 2.15C). Gleiches gilt für Konstrukte, in denen *Renilla* Luziferase als erster Reporter verwendet wird. Bei der Verwendung der Wildtyp-FMDV-IRES wird Rluc bis zu 120 mM K<sup>+</sup> effektiv translatiert; wird ein

aktives Poliovirus-IRES-Element verwendet, fällt die Translation erst ab 110 mM  $K^+$  deutlich ab (Abb. 2.15E, F).



**Abb. 2.15: Einfluss der Translation des zweiten Reporters auf die Stimulation der Translation des ersten Reporters durch ein Wildtyp-IRES-Element bei Konzentrationen von 50 bis 160 mM  $K^+$ .** A) PCR-Fragmente für die *in vitro*-Transkription von RNAs ohne den zweiten Reporter Fluc mit erstem Reporter CAT und Wildtyp-FMDV- beziehungsweise -Poliovirus-IRES. B) <sup>35</sup>S-markierte Proteine nach *in vitro*-Translation von CAT-FM RNA in RRL bei 50 bis 160 mM  $K^+$ . C) Wie in (B) mit CAT-PV RNA. D) PCR-Fragmente mit RLuc als erstem Reporter. E) Wie in (B) mit RL-FM RNA. F) Wie in (B) mit RL-PV RNA.

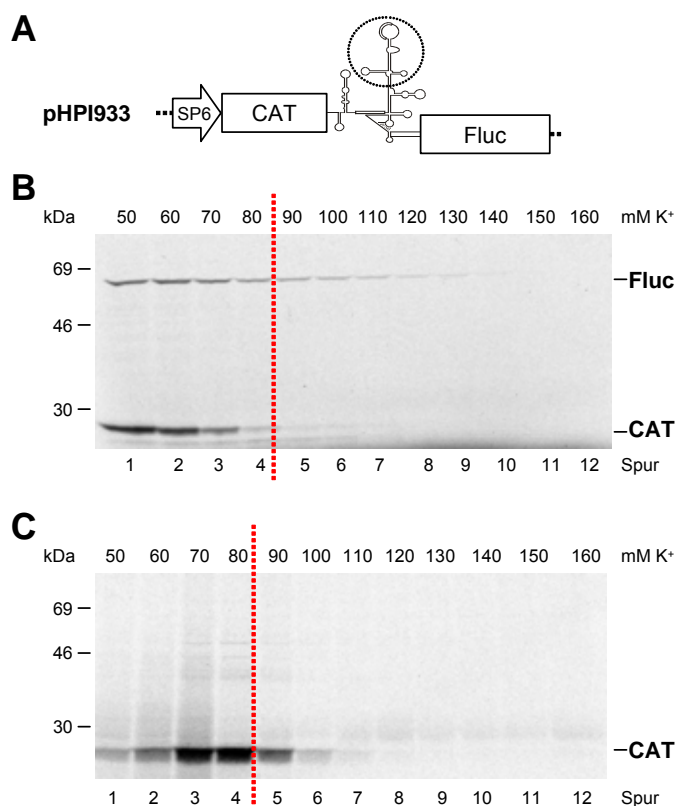
Bei der Verwendung von RNAs, die das erste Reportergen und ein funktionales IRES-Element tragen, ist die Expression des zweiten Reportergens nicht notwendig, um die Translation des ersten Reportergens zu stimulieren. Dabei ist es unerheblich, ob als erstes Reportergen RLuc oder CAT verwendet wird. Auch sind beide verwendeten picornaviralen IRES-Elemente (FMDV und Poliovirus) zu einer Stimulation der Translation des ersten Reporters in der Lage. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich nicht um eine Weitergabe von Ribosomen vom 3'- an das 5'-Ende handelt.

## 2.8 Eine HCV-IRES im dicistronischen Kontext kann keine Verstärkung der Translation des ersten Reporters bewirken

Nachdem die Weitergabe vollständiger Ribosomen vom 3'-Ende des IRES-abhängig translatierten Gens ausgeschlossen werden konnte, waren für die Stimulation der Translation des ersten Reporters durch eine funktionale IRES noch zwei Erklärungen denkbar: Durch eine aktive IRES könnte auch nur die kleine ribosomale Untereinheit an das 5'-Ende der dicistronischen RNA weitergegeben werden. Denkbar ist auch, dass Initiationsfaktoren, die für die Translation benötigt werden, nach Bindung an ein aktives IRES-Element von diesem auch *in cis* an das 5'-Ende der RNA weitergegeben werden.

Um diese Frage zu beantworten, wurde ein dicistronisches Konstrukt mit einer HCV-IRES im intercistronischen Bereich verwendet. Eine HCV-IRES kann direkt ohne die Benutzung weiterer eukaryotischer Initiationsfaktoren an die kleine ribosomale Untereinheit binden und so die Translation initiieren (Pestova et al., 1998, Spahn et al., 2001). Wenn also nur die kleine ribosomale Untereinheit von einem IRES-Element an das 5'-Ende einer dicistronischen RNA weitergegeben werden würde, so sollte bei Verwendung eines dicistronischen HCV-Konstrukts auch eine Stimulation der Translation des ersten Reporters beobachtet werden können. Im Gegensatz dazu ist für die Bindung picornaviraler IRES-Elemente an die kleine ribosomale Untereinheit die Bindung von Initiationsfaktoren für den Start der Translation unabdingbar (Meyer et al., 1995, Ochs et al., 1999, Ochs et al., 2002, Ochs et al., 2003, Pestova et al., 1996a). Sollten also tatsächlich Initiationsfaktoren von einem aktiven IRES-Element in *cis* weitergegeben werden, so müsste sich ein dicistronisches Konstrukt mit einer HCV-IRES ähnlich wie eine monocistronische RNA verhalten und den ersten Reporter nur bis etwa 80 mM  $K^+$  gut translatieren.

Die in diesem Experiment verwendeten dicistronischen RNAs haben entweder eine Wildtyp-HCV-IRES oder eine mutierte HCV-IRES (Abb. 2.16A) und beinhalten in 5'-3'-Richtung als erstes Reportergen CAT, gefolgt von einer HCV-IRES und dem zweiten Reporter Fluc. Bei der mutierten HCV-IRES del3abc fehlt ein Teil des Stem-Loop III, an den normalerweise der eukaryotische Initiationsfaktor eIF3 bindet (Pestova et al., 1998). Die Deletion des apikalen Bereichs des Stem-Loop III führt zu einem Aktivitätsverlust der HCV-IRES (Buratti et al., 1998), sie ist nicht mehr in der Lage, effizient zu translatieren und diente daher hier als Negativkontrolle.



**Abb. 2.16: Eine HCV-IRES in einem dicistronischen Kontext stimuliert nicht die Expression des stromaufwärts gelegenen Reporters.**

**A)** Die dicistronische Expressionskassette mit dem SP6-Polymerase-Promoter für die *in vitro*-Transkription der RNA, dem Gen für CAT als erstem Reporter, der HCV-IRES und dem Gen für Fluc als zweitem Reporter. In der Mutante del3abc wurden die Stem-Loops 3a, b und c (unterbrochene Linie) entfernt.

**B)** *In vitro*-Translation der dicistronischen RNA in RRL mit steigender Konzentration an  $K^+$  nach Auftrennung mittels SDS-PAGE.

**C)** Wie in (B), jedoch mit der Mutation pHP1933del3abc.

Verändert aus Jünemann et al., 2007.

Bei *in vitro*-Translationen einer dicistronischen RNA mit der Wildtyp-HCV-IRES in Kaninchen-Retikulozytenlysat mit steigenden  $K^+$ -Konzentrationen geht die Expression des ersten Reporters CAT bei Konzentrationen ab 70 mM  $K^+$  stark zurück und ist bei  $K^+$ -Konzentrationen ab 90 mM kaum noch

sichtbar. Die Expression des zweiten Reportergens Fluc ist dagegen bei Konzentrationen von 50 bis 70 mM K<sup>+</sup> sehr effizient, nimmt danach nur leicht ab und ist bis zu einer Konzentration von 120 mM K<sup>+</sup> nachweisbar (Abb. 2.16B).

Bei der Translation einer dicistronischen RNA mit dem mutierten HCV-IRES-Element del3abc konnte erwartungsgemäß keine Fluc-Expression detektiert werden (Abb. 2.16C). Die Expression des ersten Reporters CAT mit dieser RNA ist bei 80 mM K<sup>+</sup> am höchsten. Im Gegensatz zu der dicistronischen pHPI933-RNA mit der Wildtyp-HCV-IRES ist die CAT-Expression aber auch noch bis etwa 100 mM K<sup>+</sup> vorhanden. Über die Gründe dafür kann hier nur spekuliert werden. Möglicherweise dissoziieren bei einer mutierten HCV-IRES die Ribosomen etwas leichter und können bei leicht erhöhter Salzkonzentration etwas besser in *cis* transferiert werden. Wird hingegen eine Wildtyp-HCV-IRES verwendet, sind die Ribosomen stärker mit ihr assoziiert, so dass kein Transfer von Ribosomen in *cis* stattfinden kann. Beide HCV-IRES-Elemente, sowohl die Wildtyp-IRES als auch das mutierte IRES-Element del3abc, waren allerdings nicht in der Lage, die Expression des ersten Reporters über eine Konzentration von etwa 90 mM K<sup>+</sup> zu stimulieren. Die Ergebnisse dieser *in vitro*-Translationen sind mit den Werten monocistronischer Reporter vergleichbar.

HCV benötigt für die Initiation der Translation keine weiteren Initiationsfaktoren; die Bindung der kleinen ribosomalen Untereinheit ist für die Einleitung der Translation ausreichend. Da eine aktive HCV-IRES nicht in der Lage war, die Expression des ersten Reportergens zu stimulieren, kann es sich bei dem beobachteten Effekt nicht um eine Weitergabe der kleinen ribosomalen Untereinheit an das 5'-Ende der dicistronischen RNA handeln. Alle diese Ergebnisse sprechen daher für eine Weitergabe eukaryotischer Initiationsfaktoren durch ein aktives Picornavirus-IRES-Element.

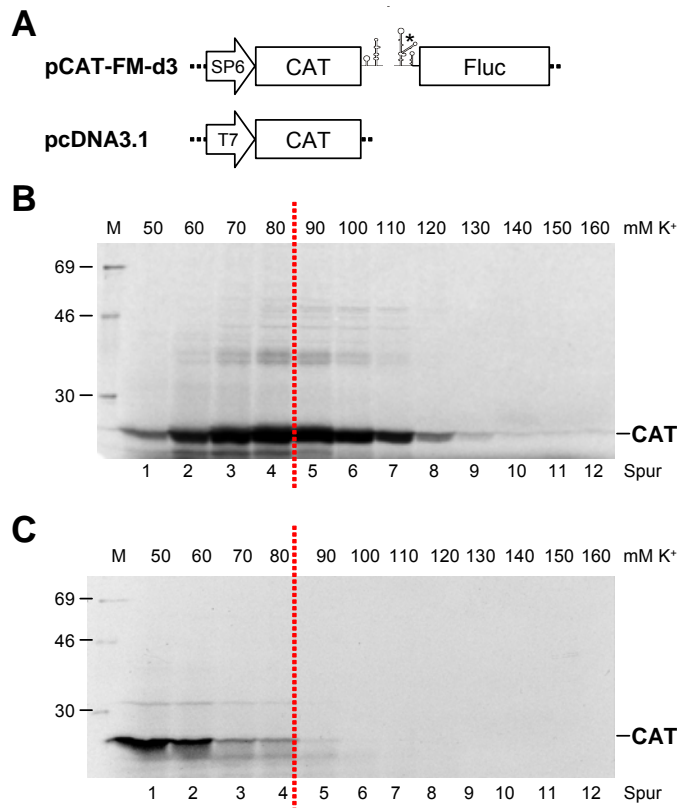
## **2.9 Die Fähigkeit einer Picornavirus-IRES, die Translation des ersten Reporters zu verstärken, wird durch ihre Fähigkeit zur Bindung von eIF4F determiniert**

Die Experimente mit dicistronischen HCV-Konstrukten belegen, dass die Translation des ersten Reporters durch die Weitergabe von eukaryotischen Initiationsfaktoren in *cis* durch eine picornavirale IRES unter physiologischen Bedingungen verstärkt werden kann. In einem nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob dafür ein aktive IRES notwendig ist. Unter einem aktiven IRES-Element ist eine IRES zu verstehen, die in der Lage ist, die Translation des stromabwärts gelegenen Reportergens zu initiieren.

Bei der in den folgenden Experimenten verwendeten FMDV-IRES wurde der Stem-Loop 3 vollständig deletiert und damit die Fähigkeit dieses IRES-Elements zur Initiation der Translation zerstört (Kühn et al., 1990, Petersen, 1995). Martinez-Salas und Koautoren konnten zeigen, dass bereits Punktmutationen im Bereich des Stem-Loop 3 der FMDV-IRES die Initiation der Translation stören und führen dies hauptsächlich auf eine daraus resultierende Veränderung der Sekundärstruktur zurück (Martinez-Salas et al., 1996). Diese Studien zeigen, dass der Stem-Loop 3 einen entscheidenden Anteil an der Aktivität des FMDV-IRES-Elements hat und obwohl der die Initiationsfaktoren bindende Stem-Loop 4 bei dieser delta3-Mutante intakt ist, kann die Translation nicht mehr initiiert werden.

In dem hier benutzten Konstrukt pCAT-FM-d3 (Petersen, 1995) folgt in 5'-3'-Richtung dem ersten Reportergen CAT eine FMDV-IRES, deren Stem-Loop 3 vollständig deletiert ist und nach dieser das zweite Reportergen Fluc (Abb. 2.17A). Bei der Benutzung von pCAT-FM-d3 in *in vitro*-Translationen in Kaninchen-Retikulozytenlysats war die Expression des ersten Reporters CAT bis zu einer Salzkonzentration von 110 mM K<sup>+</sup> hoch und noch bei 130 mM K<sup>+</sup> sichtbar (Abb. 2.17B). Wurde CAT

im Gegensatz dazu von einer monocistronischen RNA translatiert, lässt die Expression bereits bei Salzkonzentrationen ab 70 mM  $K^+$  nach und ist bei  $K^+$ -Konzentrationen höher 90 mM praktisch nicht mehr nachweisbar (Abb. 2.17C).



**Abb. 2.17: Die Stimulation der Translation des ersten Reporters ist von der Bindung und Weitergabe des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF4F bedingt.**

**A)** Die dicistronische Expressionskassette mit dem SP6-Polymerase-Promoter für die *in vitro*-Transkription der RNA, dem Gen für CAT als erstem Reporter, der FMDV-IRES mit der Deletion des Stem-Loop 3 und dem Gen für Fluc als zweitem Reporter. Ein Stern kennzeichnet die Bindungsstelle für eIF4F im Stem-Loop 4 der FMDV-IRES.

**B)**  $^{35}S$ -markiertes CAT-Protein nach *in vitro*-Translation der dicistronischen RNA von pCAT-FM-d3 in Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL) mit steigender Konzentration an  $K^+$  nach Auftrennung mittels SDS-PAGE.

**C)**  $^{35}S$ -markiertes CAT-Protein nach *in vitro*-Translation einer monocistronischen RNA (pcDNA3.1).

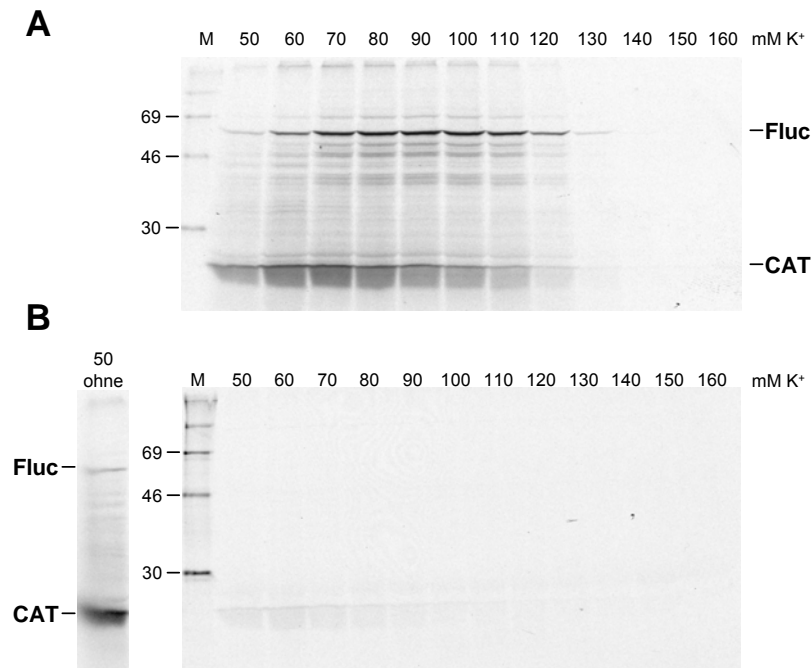
Verändert aus Jünemann et al., 2007.

Obwohl das in dieser dicistronischen RNA verwendete picornavirale IRES-Element inaktiv war, also die Fähigkeit zur Translationsinitiation des zweiten Reportergens verloren hatte, konnte es die Expression des stromaufwärts gelegenen Reporters stimulieren. Dieser Versuch zeigt deutlich, dass ein picornavirales IRES-Element einzig die Fähigkeit zur Bindung von eIF4F aufweisen muss, um die Translation des ersten Reporters unter physiologischen Bedingungen zu stimulieren. Der Proteinkomplex eIF4F kann dann an das 5'-Ende der dicistronischen RNA weitergegeben werden, wo er entweder über seine eIF4E- oder über eIF4G-Untereinheit binden und so die Expression des ersten Reporters stimulieren kann.

## 2.10 Hippuristanol inhibiert die Translation bei eIF4F-abhängigen IRES-Elementen vollständig

Um zu verifizieren, dass tatsächlich der Initiationskomplex eIF4F von einem picornaviralen IRES-Element in *cis* an das 5'-Ende einer dicistronischen RNA weitergegeben wird und so die Translation des stromaufwärts gelegenen Reporters stimuliert, wurde eIF4A durch Hippuristanol gehemmt. Der eukaryotische Initiationsfaktor eIF4A ist eine ATP-abhängige Helikase und Teil des Initiationskomplexes eIF4F. Hippuristanol, ein Steroid aus der Hornkoralle *Isis hippuris*, blockiert die Bindung von eIF4A an die RNA, infolgedessen die ATPase-Aktivität von eIF4A und verhindert so die Initiation der Translation bei eIF4F-abhängigen IRES-Elementen (Higa et al., 1981, Novac et al., 2004).

In *in vitro*-Translationen einer dicistronischen RNA mit CAT als erstem Reportergen mit steigender  $K^+$ -Konzentration von 50 bis 160 mM  $K^+$  konnten die bereits zuvor gezeigten Resultate wiederholt werden. In dieser RNA wird das erste Reportergen CAT gefolgt von einer Wildtyp-FMDV-IRES und dem zweiten Reportergen Fluc. Diese dicistronische RNA zeigte wie in früheren Experimenten (siehe auch Abb. 2.2) die Verstärkung der Translation des ersten Reporters bis zu einer Konzentration von 120 mM  $K^+$  (Abb. 2.18A). Wurden nun dem Versuchsansatz 10  $\mu$ M Hippuristanol zugegeben, wurde der zweite Reporter überhaupt nicht mehr exprimiert. Auch die Translation des ersten Reportergens war kaum sichtbar (Abb. 2.18B).

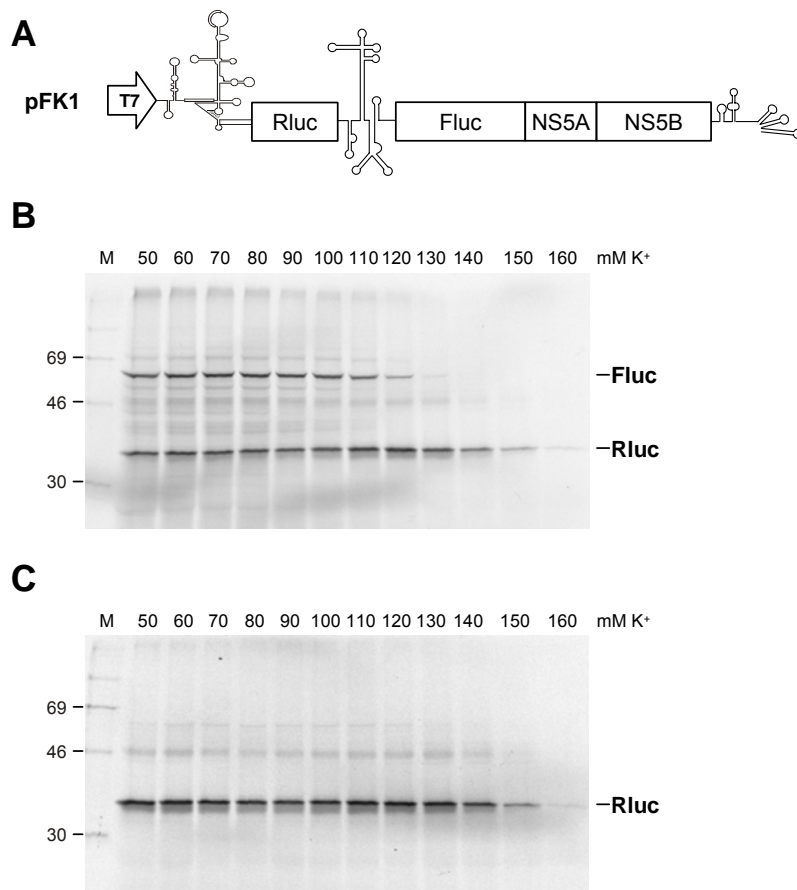


**Abb. 2.18: Hippuristanol inhibiert die Translation einer dicistronischen RNA.**

**A)** <sup>35</sup>S-markierte Reportergene nach *in vitro*-Translation der dicistronischen RNA (pCAT-FM) bei  $K^+$ -Konzentrationen von 50 bis 160 mM. **B)** Wie in (A) mit Zugabe von 10  $\mu$ M Hippuristanol. 50 ohne: Translation bei 50 mM  $K^+$  ohne Hippuristanol.

Hippuristanol bindet an eIF4A und inhibiert so die Funktion des Initiationskomplexes eIF4F vollständig. Dadurch ist auch eine picornavirale Wildtyp-IRES nicht mehr zu einer Stimulation der Expression des ersten Reporters in der Lage. Dass Hippuristanol tatsächlich nur einen Bestandteil des Initiationskomplexes eIF4F hemmt, wurde mit einer RNA überprüft, die eine HCV-IRES vor einem dicistronischen Konstrukt trägt. Das Konstrukt pFK1 trägt in 5'-3'-Richtung eine Wildtyp-HCV-IRES, gefolgt von dem ersten Reportergen Rluc, der IRES des Encephalomyocarditis Virus (EMCV) und Fluc als zweitem Reporter (Abb. 2.19A). Bei einer *in vitro*-Translation mit dieser RNA ist zu erwarten, dass die Expression des zweiten Reportergens bei Anwesenheit von Hippuristanol nicht mehr nachweisbar ist, da Hippuristanol die RNA-Helikase eIF4A hemmt (Higa et al., 1981, Novac et al., 2004). Eine Expression des ersten Reportergens sollte aber durch die HCV-IRES aufrechterhalten werden, da HCV die Translation ohne den Initiationskomplex eIF4F initiieren kann (Pestova et al., 1998, Spahn et al., 2001).

Ohne Zugabe von Hippuristanol wurde der erste Reporter Rluc bis zu einer Salzkonzentration von 140 mM  $K^+$  effektiv translatiert und der zweite Reporter Fluc bis zu einer  $K^+$ -Konzentration von 110 mM (Abb. 2.19B). Nach Zugabe von 10  $\mu$ M Hippuristanol wurde Rluc immer noch sehr effektiv bis zu einer Konzentration von 140 mM  $K^+$  translatiert, während die Expression von Fluc nicht mehr nachweisbar war (Abb. 2.19C).



**Abb. 2.19: Eine HCV-IRES vor einem dicistronischen Konstrukt hebt die Wirkung von Hippuristanol auf.**

**A)** pFK ist ein dicistronisches HCV-Replikon mit einem T7-Polymerase-Promoter für die *in vitro*-Transkription der RNA, der HCV-IRES, dem Gen für Rluc als erstem Reporter, der IRES des Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) mit ihren vier Stem-Loops, dem Gen für Fluc als zweitem Reporter und zwei Nicht-Struktur-Genen (NS) von HCV. **B)** <sup>35</sup>S-markierte Reportergene nach *in vitro*-Translation.

**C)** Wie in (B) mit 10  $\mu$ M Hippuristanol

Die EMCV-IRES benötigt, genauso wie die IRES-Elemente von FMDV und Poliovirus, neben weiteren zellulären Proteinen auch die eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF2, eIF3 und eIF4F (Pestova et al., 1996a). Demgegenüber initiiert die HCV-IRES die Translation effektiv auch ohne eIF4F. Durch Zugabe von Hippuristanol wird die an der EMCV-IRES durch den Proteinkomplex eIF4F initiierte Translation vollständig inhibiert. Die HCV-IRES hingegen ermöglicht die Initiation der Translation der Reporters Rluc auch in Anwesenheit von Hippuristanol, da sie direkt an die kleine ribosomale Untereinheit binden kann (Pestova et al., 1998, Spahn et al., 2001).

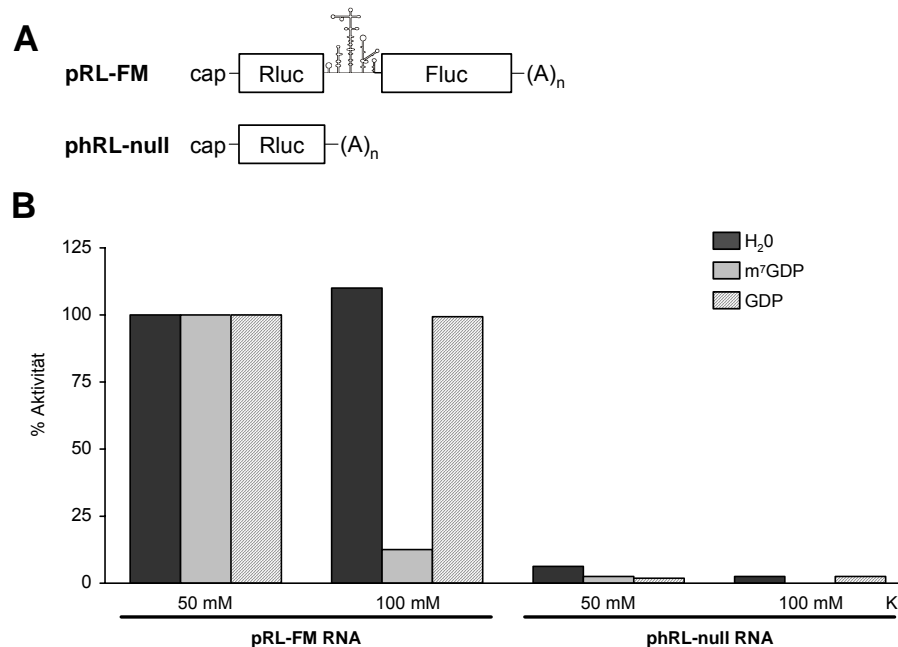
### 2.11 eIF4F verstärkt die Translation des ersten Reporters in dicistronischen Konstrukten mit einer Picornavirus-IRES

Da in Anwesenheit von Hippuristanol bei dicistronischen RNAs mit picornaviralen IRES-Elementen keine Translation beobachtet werden konnte und auch eine HCV-IRES die Expression eines stromaufwärts gelegenen Reportergens nicht stimulieren konnte, sollte in einem nächsten Schritt gezeigt werden, dass tatsächlich der Initiationskomplex eIF4F bzw. Teile davon für die Stimulation der Translation des ersten Reporters verantwortlich sind.

Während in dem vorherigen Versuch Hippuristanol die RNA-Helikase eIF4A hemmte, wurde das nun folgende Experiment in Anwesenheit von  $m^7$ GDP durchgeführt. Normalerweise bindet der Initiationskomplex eIF4F über eIF4E an das Cap-Nukleotid am 5'-Ende einer gecappten RNA. Wird dem Versuchsansatz nun  $m^7$ GDP zugegeben, so wird die Aktivität von eIF4E dadurch inhibiert und es steht für eine Bindung am 5'-Ende der gecappten RNA nicht mehr zur Verfügung.



Die in diesem Versuch verwendete dicistronische RNA wurde während der *in vitro*-Transkription mit einem Cap-Nukleotid versehen, anschließend wurde mit Hilfe von Poly(A)-Polymerase ein Poly(A)-Schwanz an das 3'-Ende angefügt. Die RNA trägt in 5'-3'-Richtung nach dem Cap das Reportergen für Rluc, gefolgt von einer Wildtyp-FMDV-IRES, dem zweiten Reportergen Fluc und einen Poly(A)-Schwanz. Als Kontroll-RNA wurde eine gecappte und polyadenylierte, für Rluc kodierende monocistronische RNA verwendet (Abb. 2.20A).



**Abb. 2.20: eIF4F ist für die Stimulation der Translation des ersten Reporters verantwortlich.**

**A)** Struktur der gecappten und polyadenylierten pRL-FM und phRL-null RNAs. cap: Cap-Nukleotid, (A)<sub>n</sub>: Poly(A)-Schwanz.

**B)** Die Aktivität des ersten Reporters Rluc nach *in vitro*-Translation der RNAs aus (A) in RRL ohne eIF4F-Inhibitor (schwarz), mit 100 μM m<sup>7</sup>GDP (grau) als eIF4E-Inhibitor und mit 100 μM GDP (schraffiert) als Kontrolle. Linke Seite: Rluc-Expression der dicistronischen RNA pRL-FM, rechte Seite: Rluc-Expression der monocistronischen RNA phRL-null, jeweils bei 50 und 100 mM K<sup>+</sup>.

Originaldaten siehe Anhang. Verändert aus Jünemann et al., 2007.

Diese gecappten und polyadenylierten mono- und dicistronischen RNAs wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysat bei Konzentrationen von 50 und 100 mM K<sup>+</sup> translatiert. Dabei wurde zu den Versuchsansätzen zusätzlich entweder Wasser, m<sup>7</sup>GDP oder GDP gegeben. GDP sollte keinen Einfluss auf die Translation haben und diente als Negativkontrolle.

Die gecappte und polyadenylierte dicistronische RNA mit FMDV-IRES translatierte den ersten Reporter Rluc bei einer Konzentration von 50 und 100 mM K<sup>+</sup> sehr effizient (Abb. 2.20B, linke Seite). Im Gegensatz dazu war die Expression von Rluc durch eine gecappte und polyadenylierte monocistronische RNA bei 100 mM K<sup>+</sup> sehr viel schlechter und entsprach in etwa nur 5% der bei einem dicistronischen Konstrukt beobachteten Translation (Abb. 2.20B, rechte Seite). Wurde dieser Versuch ohne die Zugabe von m<sup>7</sup>GDP durchgeführt, bestätigte er die bereits zuvor gemachten Experimente, mit denen eine Stimulation der Expression des ersten Reporters durch ein picornvirales IRES-Element gezeigt werden konnte. Wurde das gleiche Experiment in Anwesenheit von 100 μM m<sup>7</sup>GDP durchgeführt, so war die Expression des ersten Reporters durch das dicistronische Konstrukt bei einer K<sup>+</sup>-Konzentration von 100 mM stark verringert. Eine monocistronische RNA war bei 100 mM K<sup>+</sup>-Konzentration nicht mehr in der Lage, Rluc zu exprimieren.



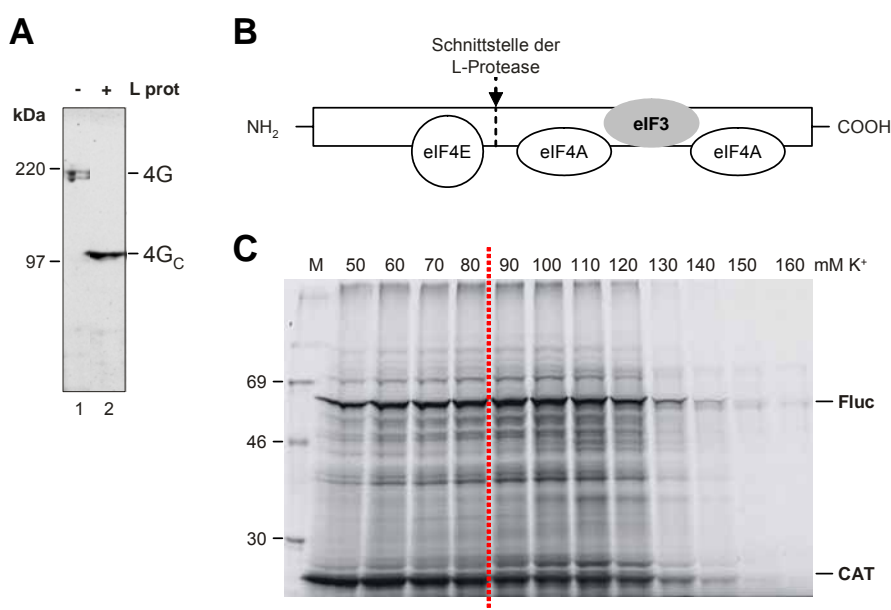
Eine picornavirale IRES kann also den Initiationskomplex eIF4F, der über sein eIF4G-Protein an sie gebunden hat, auch in *cis* an das 5'-Ende der RNA zu liefern, wo er entweder über eIF4G oder eIF4E bindet und so die Translation des ersten Reporters stimulieren kann. Wird eIF4E als ein Bestandteil des 4F-Komplexes durch Zugabe von m7GDP gehemmt, so kann der Initiationskomplex nicht mehr an das Cap-Nukleotid am 5'-Ende der RNA binden und eine Stimulation der Expression des ersten Reporters findet nicht mehr statt.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der Translation des stromaufwärts einer picornaviralen IRES gelegenen Gens durch eIF4F verursacht wird.

## 2.12 Das C-terminale Ende von eIF4G ist für die Stimulation der Translation des ersten Reporters ausreichend

Da der Initiationskomplex eIF4F entweder durch sein cap-bindendes Protein eIF4E, aber auch eIF4E-unabhängig über den zentralen Teil seines eIF4G-Proteins an RNA binden kann (De Gregorio et al., 1998, Prevot et al., 2003), sollte im folgenden Experiment gezeigt werden, dass der C-terminale Teil von eIF4G ausreichend für den beschriebenen Effekt ist. Dazu wurde Kaninchen-Retikulozytenlysat mit einer für die L-Protease von FMDV kodierenden RNA für 45 min inkubiert. L-Protease spaltet eIF4G in einen N-terminalen Teil mit der Bindungsstelle für eIF4E und einen C-terminalen Teil mit den Bindungsstellen für eIF4A und eIF3 (Abb. 2.21B). Die vollständige Spaltung von eIF4G wurde mit einem Antikörper gegen den C-terminalen Teil von eIF4G überprüft (Abb. 2.21A, Spur 2).

Das so vorbehandelte Kaninchen-Retikulozytenlysat, das nur noch gespaltenes eIF4G enthielt, wurde für die *in vitro*-Translation einer ungecappten dicistronischen RNA mit einer FMDV-IRES (Abb. 2.1A) bei Konzentrationen von 50 bis 160 mM K<sup>+</sup> verwendet. Dabei wurde der erste Reporter CAT bis zu einer Salzkonzentration von 120 mM K<sup>+</sup> sehr effizient translatiert und war bis zu einer Konzentration von 140 mM K<sup>+</sup> sichtbar. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von *in vitro*-Translationen in unbehandeltem Kaninchen-Retikulozytenlysat (Abb. 2.2B) und steht in starkem Gegensatz zum Verhalten einer monocistronischen RNA mit CAT als Reportergen (Abb. 2.2C).



**Abb. 2.21: Das C-terminale Ende von eIF4G ist für die Stimulation der Expression des ersten Reporters ausreichend.**

**A)** Western-Blot mit anti-eIF4G vor (-) und nach (+) Inkubation mit L-Protease-RNA.

**B)** Schema des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF4G mit den Bindungsstellen für eIF4E, eIF4A und eIF3 (verändert nach Prevot et al., 2003).

**C)** *In vitro*-Translation des dicistronischen Konstrukts pCAT-FM in RRL nach Spaltung von eIF4G durch Inkubation mit L-Protease-RNA für 45 min.

Verändert aus Jünemann et al., 2007.

Tatsächlich ist also der C-terminale Teil von eIF4G ausreichend, um die Translation des stromaufwärts gelegenen Reporters durch ein funktionales IRES-Element zu stimulieren. Nachdem der Proteinkomplex eIF4F über sein eIF4G-Protein an eine dicistronische RNA gebunden hat, kann er nach *cis* an das 5'-Ende der RNA geliefert werden und dort die Translation initiieren, indem er entweder über das 4E-Protein an ein Cap-Nukleotid oder, wie hier gezeigt, über das eIF4G-Protein cap-unabhängig an die RNA bindet.

### 3. Diskussion

Nachdem erste Experimente mit dicistronischen Konstrukten (Bassili, 2003) den Verdacht nahegelegt hatten, dass die interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) des Maul- und Klauenseuche-Virus (foot-and-mouth disease virus, FMDV) in einem dicistronischen Konstrukt unter physiologischen Salzkonzentrationen auch die Translation des ersten, stromaufwärts vor ihr gelegenen Reportergens stimulieren kann, sollte in dieser Arbeit gezeigt werden, ob dieser Effekt für alle IRES-Elemente von Picornaviren gilt und von welchen Faktoren er möglicherweise abhängt. Insbesondere sollten folgende Fragen geklärt werden:

- i. Zeigt nur eine FMDV-IRES diesen Effekt, oder verstärkt auch ein anderes picornavirales IRES-Element die Translation des stromaufwärts gelegenen Reporters bei physiologischen Salzkonzentrationen?
- ii. Wird durch eine Picornavirus-IRES nur die Translation eines bestimmten stromaufwärts der IRES gelegenen Reportergens verstärkt, oder ist dieser Effekt unabhängig von der Sequenz des stromaufwärts gelegenen Gens?
- iii. Wirkt die Stimulation der Translation des ersten Reporters in *cis* oder auch in *trans*?
- iv. Ist die Elongation der Translation des stromabwärts der IRES gelegenen Reporters für diesen Effekt erforderlich?
- v. Welcher Mechanismus liegt dieser Stimulation zugrunde und welche zellulären Faktoren sind daran beteiligt?

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl eine IRES vom Typ I (Entero- und Rhinoviren) als auch eine IRES des Typs II (Cardio- und Aphthoviren) unter physiologischen Salzkonzentrationen in der Lage ist, nicht nur die Translation des stromabwärts gelegenen Gens, sondern auch die Translation des sich stromaufwärts befindenden Gens zu stimulieren. Im Gegensatz dazu war eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle vom Typ IV (HCV und Pestiviren), die für die Bindung an die kleine ribosomale Untereinheit außer eIF3 und eIF2 keine weiteren eukaryotischen Initiationsfaktoren benötigt, nicht in der Lage, die Translation des ersten Reporters in einem dicistronischen Konstrukt zu stimulieren. Dieser Umstand deutete darauf hin, dass der eukaryotische Initiationskomplex eIF4F an der Stimulation der Translation des stromaufwärts der IRES liegenden Reportergens beteiligt sein könnte.

Weitere Experimente konnten zeigen, dass die Stimulation der Translation des ersten Reporters in *cis* erfolgt und unabhängig von der Art des verwendeten stromaufwärts liegenden Reporters ist. Außerdem ist die Translation des zweiten Reporters nicht notwendig, um die Translation des ersten Reporters in einem dicistronischen Konstrukt mit einer picornaviralen IRES zu stimulieren.

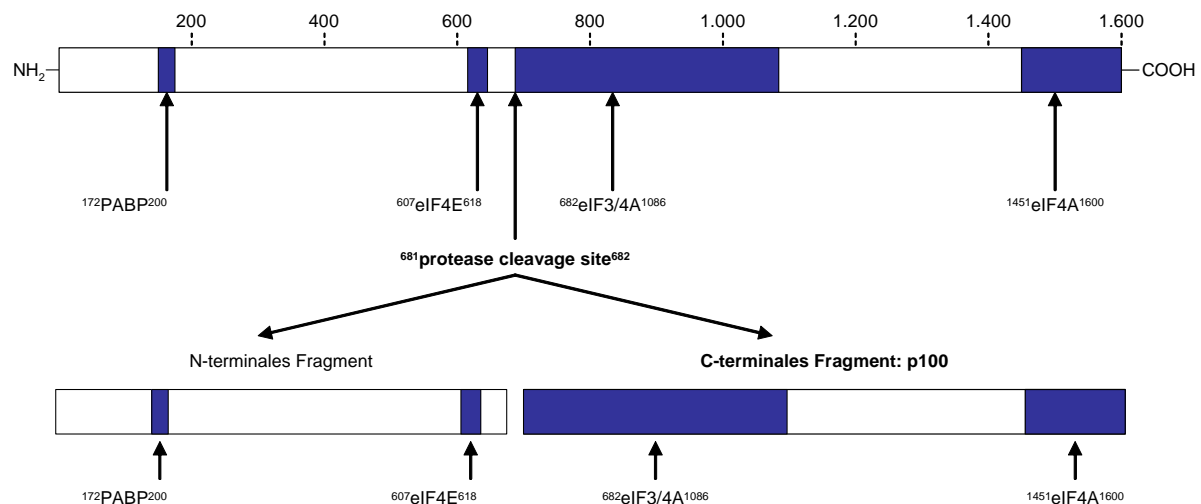
Alle diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Translation des stromaufwärts eines funktionalen IRES-Elements liegenden Reportergens durch die Weitergabe des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF4F an das 5'-Ende der RNA stimuliert werden kann.

#### 3.1 Der eukaryotische Initiationskomplex eIF4F

Der Initiationskomplex eIF4F besteht aus drei Proteinen, dem Cap-bindenden Protein eIF4E, der RNA-Helikase eIF4A und dem als Adaptor-Protein bezeichneten eIF4G. In dem Adaptor-Protein eIF4G befindet sich im N-terminalen Teil eine Bindungsstelle für eIF4E und für das Poly(A)-bindende

Protein (PABP), während sich im zentralen Teil von eIF4G Bindungsstellen für eIF3 und eIF4A befinden (Abb. 3.1). Eine zweite eIF4A-Bindungsstelle befindet sich am C-Terminus von eIF4G (Lamphear et al., 1995, Morino et al., 2000).

Unter normalen zellulären Umständen ist eIF4G Teil des Initiationskomplexes eIF4F, der bei der Cap-abhängigen Initiation der Translation eine entscheidende Rolle spielt. Dabei bindet das eIF4E-Protein des eIF4F-Komplexes an das Cap-Nukleotid der mRNA und eIF3, das an die kleine ribosomale Untereinheit gebunden ist, bindet an eIF4G. Das Adaptor-Protein eIF4G vermittelt so den Kontakt zwischen 43S-Präinitiationskomplex und mRNA.



**Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Translationsfaktors eIF4G** mit den Bindungsstellen für PABP, eIF4E, eIF4A und eIF3. Nummerierung der Aminosäuren nach SwissProt-Eintrag Q04637.

Bei Picornaviren wird die Translation nicht am Cap-Nukleotid, sondern an einer internen Ribosomen-Eintrittsstelle initiiert. Dieser Mechanismus benötigt die meisten Initiationsfaktoren, nicht jedoch das Cap-bindende Protein eIF4E, da hier eIF4G selbst an einen zentralen Stem-Loop in der internen Ribosomen-Eintrittsstelle binden kann und dadurch den Kontakt zwischen 43S-Präinitiationskomplex und viraler RNA vermittelt.

Bei einer Infektion mit einem Picornavirus kommt es durch das Wirken viraler Proteasen (z.B. L-Protease bei FMDV) zu einer Spaltung von eIF4G. Dabei wird das N-terminale Drittel von eIF4G mit seiner Bindungsstelle für eIF4E abgetrennt. Die Cap-abhängige Translation zellulärer mRNAs wird so inhibiert, während der C-terminale Teil (p100) von eIF4G in der Lage ist, bei Picornaviren eine IRES-abhängige Initiation der Translation und auch die Translation ungecappter RNAs nicht nur aufrechtzuerhalten, sondern sogar zu stimulieren (Borman et al., 1997, De Gregorio et al., 1998, Pestova et al., 1996b).

Der zentrale Teil von eIF4G, der keine Bindungsstelle für eIF4E hat, ist also für die Initiation der Translation ausreichend. Durch die Spaltung von eIF4G mit verschiedenen Proteasen konnte das Vorhandensein einer zentralen RNA-bindenden Domäne in eIF4G gezeigt werden, die nicht mit der eIF4E-bindenden Domäne identisch ist (Prevot et al., 2003a, Prevot et al., 2003b). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der zentrale Teil von eIF4G dazu imstande ist, an die IRES-Elemente von EMCV und FMDV zu binden (Kolupaeva et al., 2003, Saleh et al., 2001). Neben der Möglichkeit, dass eIF4G über das Cap-bindende Protein eIF4E an die Cap-Struktur einer RNA bindet, existiert also auch die Möglichkeit, dass eIF4G über seinen zentralen Teil direkt an eine RNA binden kann.

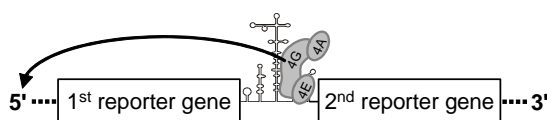
Durch die Bindung von eIF4E an eIF4G ändert sich die Konformation von eIF4G, so dass seine Affinität für ungecappte RNAs stark vermindert ist. Durch diese Konformationsänderung ist eIF4G dann nicht mehr in der Lage, an ungecappte RNAs zu binden (Tarun & Sachs, 1997).

Svitkin und Mitautoren konnten zeigen, dass die Translation zellulärer mRNAs auch cap-unabhängig erfolgen kann, wenn die Konzentration von RNA-bindenden Proteinen wie hnRNP A1, La Autoantigen und PTB gering ist. Hingegen scheint bei hohen Konzentrationen von RNA-bindenden Proteinen die mRNA nicht für die inhärente RNA-bindende Domäne von eIF4G zugänglich zu sein, so dass eIF4F nicht mehr auch über das eIF4G-Protein, sondern nur noch über eIF4E an die RNA binden kann (Svitkin et al., 1996). Im Umkehrschluss scheint also der im zentralen Teil von eIF4G vorhandene RNA-bindende Bereich auch bei der Cap-unabhängigen Translation zellulärer RNAs eine Rolle zu spielen.

### 3.2 Eine Picornavirus-IRES kann eIF4F in *cis* an das 5'-Ende der RNA liefern

Bei der hier beschriebenen Stimulation der Translation scheint die Fähigkeit von eIF4G, direkt an eine RNA binden zu können, wichtig zu sein. Der Transfer von eIF4F von einer Picornavirus-IRES als einer initialen "Initiationsfaktor-Fangzone" in der RNA zu einer anderen Stelle am 5'-Terminus der RNA kann dann mit einer gewissen Effizienz erfolgen, wenn die Konzentration der zweiten RNA-bindenden Stelle hoch genug ist, wenn sie also auf dem gleichen dicistronischen RNA-Molekül in *cis* vorhanden ist.

Dieser Transfer wird nur bei Bedingungen offensichtlich, in denen die Translation des ersten Reportergens gering wäre, würde es in einer monocistronischen RNA vorliegen. Bei niedrigen Salzkonzentrationen ist die mögliche Lieferung von Initiationsfaktoren durch eine IRES zu einem stromaufwärts liegenden Gen vernachlässigbar, weil dieses Gen ohnehin effizient translatiert wird. Bei physiologischen Salzbedingungen wird das erste Reportergen dagegen nur dann schlecht translatiert, wenn es in einer monocistronischen RNA oder einer dicistronischen RNA mit mutierter IRES vorhanden ist. Wenn dagegen ein IRES-Element mit der Fähigkeit, eIF4F zu binden, in einer RNA vorliegt, wird der erste Reporter eines dicistronischen Konstrukts mit hoher Effizienz translatiert, weil dieses picornavirale IRES-Element eIF4F in *cis* an das 5'-Ende der RNA liefern kann.



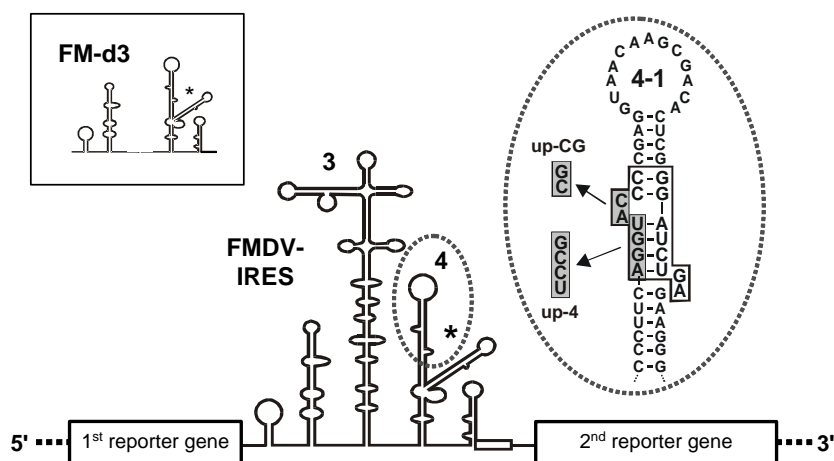
**Abb. 3.2: Ein picornavirales IRES-Element kann den Initiationskomplex eIF4F an das 5'-Ende der RNA weitergeben.**

Eine picornavirale IRES in einem dicistronischen Konstrukt ist in der Lage, den Translationskomplex eIF4F zu binden und in *cis* an das 5'-Ende der RNA weiterzugeben.

Dies konnte durch den Vergleich der Translationseffizienz einer FMDV-Wildtyp-IRES mit der drei verschiedener IRES-Mutanten klar gezeigt werden (Abb. 3.3). Die Wildtyp-IRES stimulierte unter physiologischen Bedingungen die Translation des ersten Reporters, während die beiden Stem-Loop 4-Mutanten dazu nicht in der Lage waren. Bei beiden Mutationen des Stem-Loop 4 der FMDV-IRES kann eIF4G nicht oder nur noch schlecht an die IRES binden und demzufolge weder die Translation des stromabwärts liegenden Reporters noch die des stromaufwärts liegenden Reporters effizient initiieren. Als eine dritte Mutante wurde eine FMDV-IRES verwendet, bei der der komplette Stem-Loop 3 (FM-d3) deletiert. Durch die Deletion ist die Fähigkeit dieses IRES-Elements zur Initiation der Translation zerstört (Kühn et al., 1990, Petersen, 1995). Von Martinez-Salas und Mitautoren konnte gezeigt werden, dass bereits Punktmutationen im Bereich des Stem-Loop 3 der FMDV-IRES die

Initiation der Translation stören, was wahrscheinlich auf eine daraus resultierende Veränderung der Sekundärstruktur zurückzuführen ist (Martinez-Salas et al., 1996). Diese Studien zeigen, dass der Stem-Loop 3 der FMDV-IRES einen entscheidenden Anteil an der Aktivität des IRES-Elements hat: Obwohl der die Initiationsfaktoren bindende Stem-Loop 4 bei dieser delta3-Mutante intakt ist, kann die Translation nicht mehr initiiert werden.

Die Deletion des kompletten Stem-Loop 3 der FMDV-IRES hatte daher wie erwartet zur Folge, dass das stromabwärts der IRES gelegene Reportergen nicht mehr translatiert wurde; diese IRES-Mutante ist inaktiv und kann die Translation des stromabwärts gelegenen Reporters nicht mehr initiieren. Wohl aber konnte bei dieser IRES-Mutante eine Stimulation der Translation des ersten, vor der IRES gelegenen Reporters beobachtet werden, die in etwa so effizient wie bei Verwendung einer Wildtyp-FMDV-IRES war. Da in dieser Mutation der Stem-Loop 4 intakt ist, kann eIF4G hier binden und wird unter physiologischen Salzkonzentrationen mit einer gewissen Effizienz auch an das 5'-Ende der RNA weitergegeben.



**Abb. 3.3: Schematische Darstellung einer dicistronischen RNA mit FMDV-IRES.** Stem-Loops 3 und 4 sind gekennzeichnet. Gestrichelte Linie: Bereich des Stem-Loop IV mit den beiden gekennzeichneten Mutationen. In der IRES-Mutante FM-d3 (Box) ist der komplette Stem-Loop III entfernt. Ein Stern kennzeichnet die Bindungsstelle für eIF4G im Stem-Loop IV der FMDV-IRES.

Die Stimulation der Translation des ersten Reportergens konnte auch beobachtet werden, wenn der eukaryotische Initiationsfaktor eIF4G zuvor mit der L-Protease von FMDV geschnitten wurde. L-Protease spaltet eIF4G in ein N-terminales Fragment mit der Bindungsstelle für eIF4E und ein C-terminales Fragment (p100) mit den Bindungsstellen für eIF3 und eIF4A. *In vitro*-Versuche mit mit L-Protease vorbehandelten Kaninchen-Retikulozytenlysate zeigen, dass der zentrale Teil von eIF4G für eine Stimulation der Translation des stromaufwärts gelegenen Reporters durch eine picornavirale IRES ausreichend ist.

Eine Picornavirus-IRES mit der Fähigkeit, eIF4G zu binden, ist also in der Lage, eIF4G an das 5'-Ende der RNA zu liefern. Am 5'-Ende der RNA kann eIF4G dann entweder über seine zentrale RNA-bindende Domäne oder, falls es sich im Initiationskomplex eIF4F befindet, über das Cap-bindende Protein eIF4E an die RNA binden und so die Translation stimulieren.

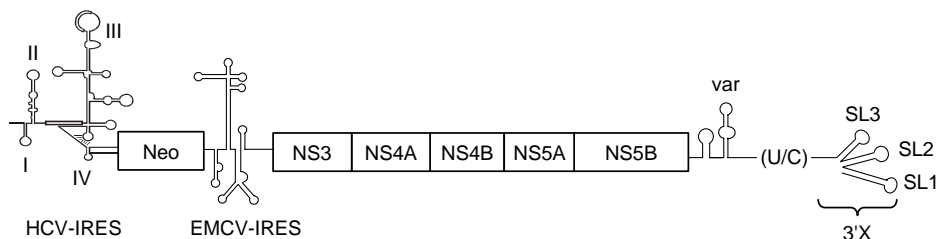
### 3.3 Auswirkungen für das Design von polycistronischen Reporterkonstrukten und Replikonsystemen

Die in dieser Arbeit beschriebene Stimulation der Translation eines stromaufwärts eines funktionalen IRES-Element liegenden Reporters hat in erster Linie Einfluss auf die Interpretation von Studien und Experimenten, die dicistronische Konstrukte mit einer picornaviralen IRES verwenden.

Dies gilt insbesondere für das Design von Replikonsystemen mit einer picornaviralen IRES, die für die Analyse der Translation und Replikation von einzelsträngigen RNA-Viren mit positiv orientiertem Genom verwendet werden, da eine interne Picornavirus-IRES in einem solchen System die Aktivität des stromaufwärts gelegenen Reporters in *cis* beeinflussen und dadurch die modulierenden Effekte einer Mutation in den viralen Sequenzen auf die Translation überdecken kann.

So werden beispielsweise für die Erforschung von Hepatitis C Virus (HCV) Replikons eingesetzt, da HCV nur mit geringer Effizienz in Zellkultur repliziert und als einziges Tiermodell nur der Schimpanse zur Verfügung steht. Diese erstmals von Lohmann et al. 1999 entwickelten HCV-Replikons sollen molekulare Studien der HCV-Replikation und Pathogenese sowie die Entwicklung antiviraler Substanzen ermöglichen.

In solchen dicistronischen Replikons befindet sich in 5'-3'-Richtung die HCV-IRES mit einem Teil der Core-Sequenz, gefolgt von dem Gen Neo (Neomycin-Phosphotransferase), der EMCV-IRES, den HCV-Sequenzen für nicht-strukturelle Proteine und die 3'-UTR von HCV (Abb. 3.4). Das Neo-Gen wird als Selektionsmarker für eine stabile Transformation in Zellen verwendet, da die Zellen dadurch resistent gegen Aminoglycosid-Antibiotika wie beispielsweise Kanamycin und G418 werden (Yenofsky et al., 1990).



**Abb. 3.4: Dicistronisches HCV-Replikon.** I bis IV: Nummerierung der HCV-Stem-Loops; neo: Neomycin-Phosphotransferase; EMCV: Encephalomyocarditis-Virus; NS3A bis NS5B: kodierende Sequenzen für die nicht-strukturellen HCV-Proteine; var: variable Region; poly(U/C): Polypyrimidin-Trakt; SL1 bis 3: Stem-Loops der HCV-3'-UTR (3'X-Region). Verändert nach Lohmann et al., 1999.

Während die Translation des Neo-Gens in solchen Replikons von der HCV-IRES gesteuert wird, steuert die EMCV-IRES die Translation der Nicht-Struktur-Proteine von HCV. Wird nun eine Mutation in einen der Stem-Loops der HCV-IRES eingeführt, so sollte weniger Neo exprimiert werden, und die so transformierten Zellen sollten Antibiotika-sensitiv bleiben.

Da eine picornavirale IRES, wie die in diesem Replikon verwendete EMCV-IRES, eIF4F auch in *cis* an das 5'-Ende der RNA liefern kann, gleicht sie dadurch aber Unterschiede in der Translationseffizienz aus und eine Zuordnung des Effekts einer Mutation in der viralen RNA zum Prozess der Translation wird dadurch unmöglich. Ein Einfluss dieser Mutation auf die Replikation bleibt aber durch die Beobachtung der Genom-Vervielfältigung sichtbar. Bei der Betrachtung der Auswirkung von Mutationen in der Sequenz der 5'-UTR von HCV sind allein in den Jahren 2000 bis

2007 (Stand Juni 2007) über 150 Publikationen erschienen, in denen mittels dicistronischer Replikonsysteme Aussagen über die Translation von HCV getroffen worden sind.

Auch die Frage einer möglichen Beteiligung der 3'-UTR von HCV bei der Translation ist in der Vergangenheit kontrovers diskutiert worden. Während einige Arbeitsgruppen einen Effekt der 3'-UTR zeigen konnten, berichteten andere Gruppen, dass die 3'-UTR keinen Einfluss auf die Translation, sondern lediglich auf die Replikation von HCV habe (Tab. 3.1).

**Tab. 3.1: Publikationen über eine mögliche Rolle der 3'-UTR von HCV bei der Translation**

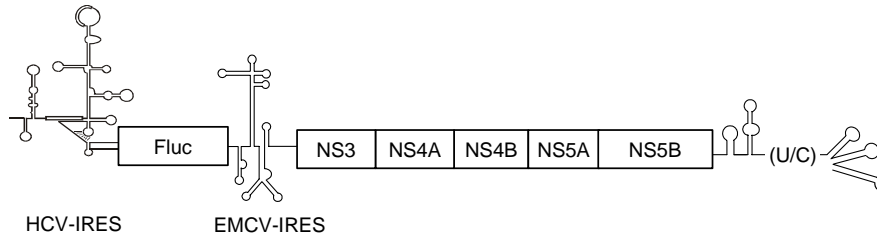
Referenz	In vitro	Extrakt	In vivo	Zellen	Nucleinsäure	Topologie	Expressions-kassette	3'-UTR/3'X	Präzises 3'-Ende
(Ito et al., 1998)	2-5 x	RRL	2-5 x		DNA	linear	mono-/dicistr.	X	nein
(Ito & Lai, 1999)	5 x	RRL					monocistr.	X	nein
(Michel et al., 2001)	3 x	RRL					monocistr.	X	nein
(Murakami et al., 2001)	–	RRL					monocistr.	UTR	nein
(Fang & Moyer, 2000)	o	HeLa, HepG2					monocistr.	UTR	nein
(McCaffrey et al., 2002)	o	RRL	5-10 x	HeLa, mice	DNA	linear	monocistr.	UTR	nein
(Kong & Sarnow, 2002)			No	Huh7, non-liv.	DNA	linear	monocistr.	UTR	nein
(Imbert et al., 2003)			No	Huh7, HepG2, Hep3B, 293	DNA	zirk.	dicistronisch	UTR	nein
(Friebe & Bartenschlager, 2002)			no	Huh7	RNA		dicistronisch	UTR	ja
(Yi & Lemon, 2003)			No	Huh7	RNA		dicistronisch	UTR	ja
(Bradrick et al., 2006)	5 x	HeLa	2-5 x	Huh7	RNA		monocistr.	UTR	ja
(Song et al., 2006)	o	RRL	10-20 x	Huh7, HepG2	RNA		monocistr.	UTR	ja

–: herabgesetzte Translation; o: kein Einfluss auf die Translation; RRL: rabbit reticulocyte lysate (Kaninchen-Retikulozytenlysat); non-liv: keine Leberzelllinie; zirk.: zirkulär; monocistr.: monocistronisch; X: nur Stem-Loops 1 bis 3 der 3'-UTR; UTR: vollständige 3'-UTR; nein: kein authentisches 3'-Ende; ja: authentisches 3'-Ende. Tabelle verändert nach Song, 2006.

Wegen des stimulierenden Effekts einer picornaviralen IRES auf den stromaufwärts gelegenen Reporter ist es auch hier nicht möglich, eine Auswirkung von Mutationen in der Sequenz der 3'-UTR von HCV bei Verwendung von dicistronischen Reporterkonstrukten zu erkennen. Dies ist wahrscheinlich auch die Ursache dafür, dass von verschiedenen Arbeitsgruppen kein Effekt auf die Translation, sondern nur auf die Replikation beschrieben wurde (Friebe & Bartenschlager, 2002, Yi & Lemon, 2003). So benutzten Friebe & Bartenschlager 2002 ein dicistronisches HCV-Replikon, um Auswirkungen von Mutationen der 3'-UTR auf die Replikation und die Translation festzustellen. Dieses Replikon trägt statt des Neo-Gens des eben beschriebenen Replikons als ersten Reporter das Fluc-Reportergen (Abb. 3.5).

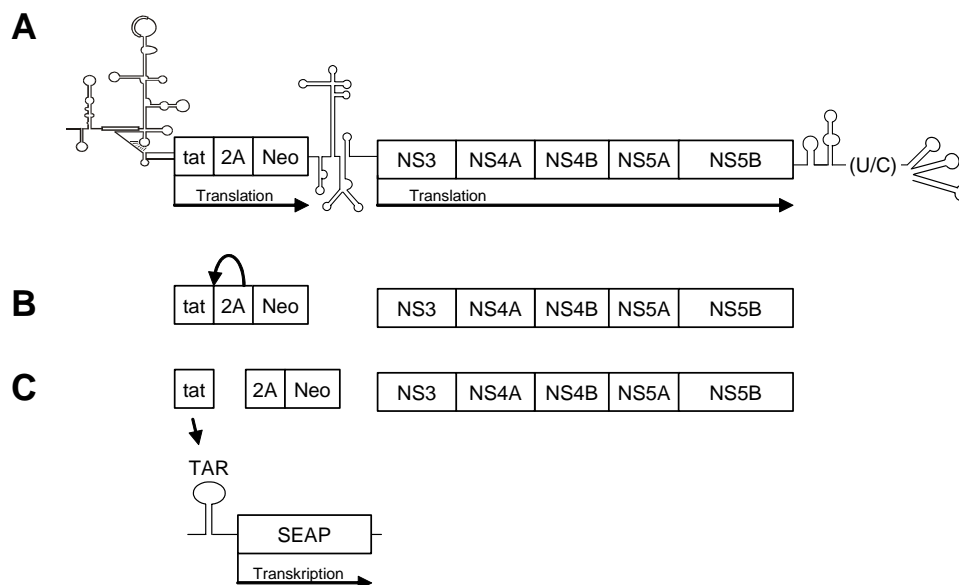


Die Expression von Fluc diente als Maß für die Transfektionseffizienz. Während in dieser Studie Auswirkungen der Mutation verschiedener Bereiche in der 3'-UTR von HCV auf die Replikation gezeigt werden konnten, konnten die Autoren keinen Einfluss dieser Deletionen oder Substitutionen auf die Translation feststellen.



**Abb. 3.5: Dicistronisches HCV-Replikon mit Fluc-Reportergen vor einer picornaviralen IRES.** EMCV: Encephalomyocarditis-Virus; NS3A bis NS5B: kodierende Sequenzen für die nicht-strukturellen HCV-Proteine. Verändert nach Friebe & Bartenschlager, 2002.

Auch in einer 2003 erschienenen Studie von Yi & Lemon werden dicistronische HCV-Replikons zur Untersuchung der Auswirkungen von 3'-UTR-Mutationen verwendet. In diesem Replikon befindet sich als erstes Reportergen das Tat-Protein des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6: Dicistronisches HCV-Replikon Ntat2ANeo.** tat: Tat-Protein des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV); 2A: FMDV-2A-Protease; Neo: Neomycin-Phosphotransferase; EMCV: Encephalomyocarditis-Virus; NS3A bis NS5B: kodierende Sequenzen für die nicht-strukturellen HCV-Proteine. **A)** Die HCV-IRES initiiert die Translation des Fusionsproteins tat-2A-Neo, und die EMCV-IRES initiiert die Translation der Nicht-Struktur-Proteine von HCV. **B)** Das Fusionsprotein tat-2A-Neo wird von der 2A-Protease autokatalytisch zerschneidet und das tat-Protein so freigesetzt. **C)** Das Tat-Protein bindet an den LTR-Promoter und induziert die Transkription der SEAP-mRNA. Verändert nach Yi & Lemon, 2003.

Das HIV-Tat-Protein ist ein transkriptionaler Transaktivator des LTR-Promoters von HIV und interagiert mit einer RNA-Struktur, dem sogenannten *transactivation responsive element* (TAR). Tat fördert die effiziente Elongation von Transkripten, die unter der Kontrolle eines LTR-Promoters stehen. Ist kein Tat-Protein in den Zellen vorhanden, werden RNA-Transkripte, die durch den LTR-Promoter initiiert worden sind, vorzeitig terminiert (Yi et al., 2002). Wird dieses Replikon nun in stabil transformierte Huh7-Zellen, in die die Sequenz für SEAP (Secreted Alkaline Phosphatase)

zusammen mit einem LTR-Promoter integriert wurde, transformiert, soll die in den Überstand sekretierte SEAP als Maß für die Replikationseffizienz verwendet werden.

Allerdings sind aufgrund der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Stimulation der Translation des stromaufwärts gelegenen Reporters dicistronische Replikons nicht dazu geeignet, Aussagen über die Translation von HCV zu machen. Die Auswirkungen von in die 5'- oder 3'-UTR eingefügten Mutationen auf die Translation werden durch diesen Effekt überdeckt und bleiben so unbemerkt. Ein möglicher Effekt solcher Mutationen in der zu untersuchenden Sequenz würde hingegen bei Verwendung einer monocistronischen RNA eher entdeckt werden. So konnte in zwei kürzlich erschienenen Studien (eine davon aus unserem Labor) gezeigt werden, dass die Mutation von Sequenzen in der 3'-UTR von HCV tatsächlich Auswirkungen auf die Translation hat, da in diesen Studien monocistronische Konstrukte mit einem authentischen 3'-Ende verwendet wurden (Bradrick et al., 2006, Song et al., 2006). Als Konsequenz der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Stimulation der Translation durch eine Picornavirus-IRES sollten für die Erforschung des Effekts von Mutationen in viralen Sequenzen daher in Zukunft ausschließlich monocistronische Reporter verwendet werden.

Dies gilt nicht nur für die Erforschung von Mutationen, sondern insbesondere auch bei der Untersuchung des Effekts von microRNAs auf die Translation zellulärer und viraler RNAs. MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, etwa 21 Nukleotide lange, nicht-kodierende RNAs, die die Stabilität zellulärer und viraler RNA und ihre Translation beeinflussen (Kren & Steer, 1996, Pillai et al., 2007). Ihre Rolle bei der Genexpression ist bisher nicht vollständig verstanden, sie scheinen aber eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen zu spielen. Einige miRNAs werden gewebespezifisch exprimiert oder sind nur in einem bestimmten Entwicklungsstadium nachweisbar (Fu et al., 2005, Garneau et al., 2007, He & Hannon, 2004, Lagos-Quintana et al., 2002, Poy et al., 2004).

In Lebergewebe und Hepatoma-Zelllinien wie Huh7 sind verschiedene miRNAs nachgewiesen worden. Die in Leberzellen dominierende miRNA ist miR-122 (Chang et al., 2004, Fu et al., 2005, Lagos-Quintana et al., 2002). Da die Ursachen für durch Viren wie HCV ausgelöste Lebererkrankungen noch immer zu einem großen Teil ungeklärt sind, ist eine leberspezifische miRNA von besonderem Interesse bei der Erforschung von HCV. In einer aktuellen Studie haben Jopling und Koautoren mit einem dicistronischen HCV-Replikon (Abb. 3.6A) gezeigt, dass die Bindung von miR-122 an eine Sequenz in der 5'-UTR von HCV die Replikation in Huh7-Zellen stimuliert. Einen Einfluss dieser microRNA auf die Translation von HCV schlossen die Autoren allerdings aus (Jopling et al., 2005). In letzter Zeit sind viele, wenn auch teilweise widersprüchliche Studien veröffentlicht wurden, die einen Einfluss von microRNAs auf die Translation zellulärer mRNAs belegen (Kren & Steer, 1996, Pillai et al., 2007). Daher wäre es sicher interessant, Einflüsse der miR-122 und eventuell weiterer leberspezifischer microRNAs auf die Translation von HCV mittels monocistronischer HCV-Replikons zu untersuchen.

### **3.4 Fazit**

Da HCV nur mit geringer Effizienz in Zellkultur repliziert, sind Replikonsysteme für die Untersuchung der Replikation und Pathogenese von HCV sowie die Entwicklung antiviraler Substanzen außerordentlich wichtig. Werden dicistronische HCV-Replikons mit einer Picornavirus-IRES für die Translation der Nicht-Struktur-Proteine von HCV verwendet, sollten allerdings keine

Aussagen über mögliche Auswirkungen von Mutationen in der viralen Sequenz auf die Translation gemacht werden, da ein picornavirales IRES-Element auch die Translation des stromaufwärts gelegenen Reporters stimulieren kann. Denkbar wäre der Einsatz eines IRES-Elements, dass die Initiation der Translation ohne Bindung des eIF4F-Komplexes durchführen kann. Da wahrscheinlich auch alle IRES-Elemente zellulärer mRNAs den kompletten Satz an Initiationsfaktoren außer dem Cap-bindenden Protein eIF4E benötigen (Gingras et al., 1999), kommen diese IRES-Elemente nicht in Frage. Neben der HCV-IRES gibt es aber einige IRES-Elemente viralen Ursprungs, die die Translation ohne den eIF4F-Komplex initiieren können. Geeignet wären beispielsweise Viren aus der Insekten-pathogenen Familie *Dicistroviridae*, die ein einzelsträngiges, positiv-orientiertes RNA-Genom mit zwei nicht überlappenden offenen Leseraster besitzen, deren beider Translation durch eine IRES initiiert wird (Wilson et al., 2000). Geeignet wäre möglicherweise auch die IRES des Taura-Syndrom Virus (TSV), die zur Initiation und Elongation der Translation lediglich die beiden ribosomalen Untereinheiten, die eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF1A und eIF2 und tRNAs benötigt (Cevallos & Sarnow, 2005).

Als Konsequenz der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Stimulation der Translation durch eine Picornavirus-IRES sollten diese picornaviralen IRES-Elemente in Zukunft nicht mehr in viralen Replikonsystemen zur Analyse viraler Sequenzen oder der Funktion der IRES-Elemente selbst eingesetzt werden.

## 4. Materialien und Methoden

### 4.1 Mikrobiologische Methoden

#### 4.1.1 Bakterienstamm

Dem verwendeten Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) fehlt eine Endonuklease-Aktivität (*endA1*) sowie eine Rekombinations-Aktivität (*recA*). Die fehlende Endonuklease-Aktivität erhöht die Qualität der präparierten Plasmid-DNA. Die fehlende Rekombinations-Aktivität erhöht die Stabilität des Inserts. Die Mutation *hsdR* schützt die einklonierte DNA vor dem Zerschneiden durch das *EcoK*-Endonuklease-System. Ferner eignet sich XL1-Blue für die Klonierung unmethylierter DNA, da ihm die Methylasen für die Methylierung von Adeninen und Cytosinen fehlen (*dam*, *dcm*). Eine Selektion erfolgt über die Tetrazyklin-Resistenz des Bakterienstammes.

#### 4.1.2 Nährböden und Flüssigmedien

Nährböden, bestehend aus LB-Medium und 1,5% (w/v) Bacto-Agar, wurden über das Klinikum Gießen bezogen. Standard-I-Medium und LB-Medium wurden im Labor angesetzt und autoklaviert. Sollten die Nährböden zur Selektion positiver Klone verwendet werden, wurden sie mit den in Tab. 4.2 angegebenen Volumina Antibiotika vorbehandelt.

**Tab. 4.1: Verwendete Flüssigmedien**

Standard-I-Medium (pH 7.2)		LB-Medium (pH 7.0)	
15 g/L	Pepton	5,0 g/L	Hefeextrakt
3 g/L	Hefeextrakt	10,0 g/L	Bacto-Trypton
6 g/L	Natriumchlorid	10,0 g/L	Natriumchlorid
1 g/L	D(+)-Glucose		

#### 4.1.3 Antibiotika

Der verwendete Bakterienstamm XL1-Blue trägt eine Tetrazyklin-Resistenz. Positive Klone wurden über die auf dem jeweiligen Plasmid kodierte Resistenz selektioniert. Chloramphenicol ist weiterhin auch Bestandteil des Nachweises von Chloramphenicol-Acetyltransferase (siehe 4.3.5.5).

**Tab. 4.2: Konzentrationen der verwendeten Antibiotika**

Antibiotikum	Endkonzentration/ 1 mL Nährboden	Endkonzentration/ 1 mL Flüssigmedium
Ampicillin	175 µg	150 µg
Tetrazyklin	12 µg	10 µg
Kanamycin	30 µg	30 µg
Chloramphenicol	30 µg	25 µg

#### 4.1.4 Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen (Kalziumchlorid-Methode)

Bakterienzellen einer Übernachtskultur wurden mit Standard-I-Medium 1:100 verdünnt und bei 37 °C bis zu einer Dichte von OD<sub>600</sub> von 0,25 bis 0,30 inkubiert. Anschließend wurden sie zentrifugiert (5.000 x g, 10 min, 4 °C), das Pellet in 1/10 Volumen eiskaltem, 30 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (3.000 x g, 20 min, 4 °C) wurde das Pellet in 1/50 Volumen eiskaltem, 30 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und auf Eis aufbewahrt. Diese

transformationskompetenten Bakterienzellen sind auf Eis im Kühlraum für einige Tage, oder versetzt mit 1/5 Volumen 60% Glycerin und Lagerung bei -70 °C etwa sechs Monate, haltbar.

#### **4.1.5 Transformation von Plasmid-DNA oder Ligationsansätzen in kompetente Bakterienzellen**

0,001 pmol/μL Plasmid-DNA bzw. Ligationsansätze (siehe 4.2.3.2) wurden mit 100 μL kompetenten Bakterienzellen für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem kurzen Hitzeschock (2 min, 42 °C) und weiteren 5 min auf Eis wurden 900 μL Standard-I-Medium dazugegeben und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (3.000 x g, 5 min, RT) wurden 800 μL Überstand abgenommen, das Pellet in den restlichen 200 μL resuspendiert und die transformierten Bakterien auf Nährböden mit Selektionsmedium ausplattiert. Bei allen Transformationen wurden zwei Kontrollen mitgeführt: Um die Kompetenz der Bakterienzellen zu testen, wurde 0,001 pmol beliebige Plasmid-DNA transformiert. Zur Überprüfung der Dephosphorylierung des Vektors wurde eine Ligation ohne Fragment durchgeführt und ebenfalls transformiert.

## **4.2 Molekularbiologische Methoden**

### **4.2.1 Klonierungen**

Bei allen in dieser Arbeit klonierten Plasmide geht aus ihrem Namen die Natur des ersten Reportergens (CAT für Chloramphenicol-Acetyltransferase und RL für *Renilla* Luziferase) sowie die Art der zwischen den zwei Reportergenen liegenden IRES (FM für Maul- und Klauenseuche Virus und PV für Poliovirus) hervor. pD12-wt (Ochs et al., 1999), pD12-up-4 und pD12-up-CG (Bassili et al., 2004) wurden zum besseren Verständnis in pCAT-FM-wt, -up-4 und -up-CG umbenannt.

#### **4.2.1.1 Dicistronische Konstrukte mit einer FMDV-IRES**

pCAT-FM-wt (Ochs et al., 1999) enthält einen SP6 Promoter, das Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) und die Wildtyp-FMDV-IRES, deren 11. AUG direkt an das Gen für Firefly Luziferase fusioniert wurde. pCAT-FM-up-4 (Bassili et al., 2004) hat den gleichen Aufbau wie pCAT-FM-wt mit Ausnahme der IRES, die eine Mutation im Stem-Loop 4 (engl. *stem* = Stamm, *loop* = Öse, Schleife) trägt. Dort wurden im apikalen Bereich die Nukleotide AGGU zu UCCG mutiert. Diese Sequenzänderung im Stem-Loop 4 führt zu einer Strukturänderung, so dass der in der Wildtyp-IRES vorhandene Stamm aufgelöst wird. Im Plasmid pCAT-FM-up-CG (Bassili et al., 2004) wurden im apikalen Bereich des Stem-Loop 4 die beiden Nukleotide AC zu CG mutiert. Diese Mutation verändert nur die Sequenz, nicht aber die Struktur des Stem-Loop 4 der FMDV IRES. Zur Herstellung von pCAT-FM-d3 wurde aus pCAT-FM-wt die vollständige Sequenz des Stem-Loop 3 herausgeschnitten (Petersen, 1995).

Für die Konstruktion von pRL-FM-wt, pRL-FM-up-4 und pRL-FM-up-CG wurde das Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) aus den entsprechenden pCAT-FM-Plasmiden herausgeschnitten und die T7-Polymerase-Promotersequenz zusammen mit dem Gen für *Renilla* Luziferase aus dem Plasmid pRL-null (Promega) eingesetzt.

**Tab. 4.3: Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten mono- und dicistronischen Konstrukte**

Plasmid	Typ	Reporter vor der IRES	IRES	Referenz
pFM (pM12)	monocistronisch		FMDV	(Ochs et al., 1999)
pMPolio	monocistronisch		PV	(Ochs et al., 2002)
pMPolio-S.3	monocistronisch		PV	(Ochs et al., 2003)
pMPolio-delV	monocistronisch		PV	(Ochs et al., 2003)
phRL-null	monocistronisch			Promega
pcDNA3.1(+)/CAT	monocistronisch			Invitrogen
pcDNA4/HisMax/lacZ	monocistronisch			Invitrogen
pHPI933	dicistronisch		HCV	P. Mavromara (Athen, Griechenland)
pHPI933-del3abc	dicistronisch		HCV	(Jünemann et al., 2007)*
pFMDV14	monocistronisch		FMDV	(Saleh et al., 2001)
pCAT-FM-wt (pD12)	dicistronisch	CAT	FMDV (wt)	(Ochs et al., 1999)
pCAT-FM-up-4 (-4M)	dicistronisch	CAT	FMDV (mut)	(Bassili et al., 2004)
pCAT-FM-up-CG (-RAC)	dicistronisch	CAT	FMDV (mut)	(Bassili et al., 2004)
pCAT-FM-d3	dicistronisch	CAT	FMDV (mut)	(Petersen, 1995)
pRL-FM-wt	dicistronisch	Rluc	FMDV (wt)	(Jünemann et al., 2007)
pRL-FM-up-4	dicistronisch	Rluc	FMDV (mut)	(Jünemann et al., 2007)
pRL-FM-up-CG	dicistronisch	Rluc	FMDV (mut)	(Jünemann et al., 2007)
pCAT-PV-wt	dicistronisch	CAT	PV	(Jünemann et al., 2007)
pCAT-PV-S.3	dicistronisch	CAT	PV	(Jünemann et al., 2007)
pCAT-PV-delV	dicistronisch	CAT	PV	(Jünemann et al., 2007)
pRL-PV-wt	dicistronisch	Rluc	PV	(Jünemann et al., 2007)
pRL-PV-S.3	dicistronisch	Rluc	PV	(Jünemann et al., 2007)
pRL-PV-delV	dicistronisch	Rluc	PV	(Jünemann et al., 2007)

CAT: Chloramphenicol-Acetyltransferase, Rluc: *Renilla* Luziferase, wt: Wildtyp, mut: Mutante, FMDV: Foot-and-mouth disease virus (Maul- und Klauenseuchevirus), PV: Poliovirus. In allen dicistronischen Plasmiden folgt der IRES das Reportergen für Firefly Luziferase (Fluc), \* Mutante hergestellt von Y. Song. Plasmidkarten siehe Anhang.

#### 4.2.1.2 Dicistronische Konstrukte mit einer PV-IRES

Für die Herstellung des Plasmids pRL-PV-wt wurde die T7-Polymerase Promotersequenz zusammen mit dem Gen für *Renilla* Luziferase aus dem Plasmid phRL-null vor die Poliovirus-IRES des Plasmids pMPolio (Ochs et al., 2002) eingesetzt. pRL-PV-S.3 und pRL-PV-delV wurden erzeugt, indem die Wildtyp-IRES in pRL-FM-wt durch die mutierten IRES-Elemente aus den Plasmiden pMPolio-S.3 bzw. pMPolio-delV (Ochs et al., 2003) ersetzt wurden. Im Plasmid pRL-PV-S.3 wurde in Stem-Loop V an Position 469 C zu T mutiert. In pRL-PV-delV wurde die vollständige Sequenz des Stem-Loop V herausgeschnitten.

In pCAT-PV-wt ersetzt das CAT-Gen aus pCAT-FM-wt (Ochs et al., 1999) das Rluc-Reportergen in pRL-PV-wt. Zur Herstellung von pCAT-PV-S.3 und pCAT-PV-delV wurde die Wildtyp-IRES in pCAT-PV-wt durch die mutierten PV-IRES-Elemente aus den Plasmiden pMPolio-S.3 bzw. pMPolio-delV (Ochs et al., 2003) ersetzt.

#### 4.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte im kleinen Maßstab ("Minipräparation") mit "GFX *Micro* Plasmid Prep Kit" (Amersham Biosciences) oder im großen Maßstab ("Maxipräparation") mit "NucleoBond AX 100" (Macherey-Nagel).

In beiden Fällen werden die Bakterienzellen unter alkalischen Bedingungen lysiert. Dabei denaturieren sowohl chromosomale als auch Plasmid-DNA. Wird zu diesem Lysat Kaliumacetat zugegeben, präzipitiert die chromosomale DNA sowie andere Bestandteile der Bakterienzelle, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt. Kaliumacetat neutralisiert gleichzeitig die Lösung, so dass die beiden Stränge der Plasmid-DNA wieder hybridisieren, während die größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und ausfällt. Nach Zentrifugation wird der Überstand über einen Anionen-Austauscher gereinigt.

#### 4.2.2.1 Minipräparation mit "GFX Micro Plasmid Prep Kit" (Amersham Biosciences)

Das "GFX Micro Plasmid Prep Kit" von Amersham Biosciences wurde zur Extraktion von Plasmid-DNA aus 1,5 mL-Übernachtskulturen verwendet. Die neutralisierte DNA-Lösung bindet an eine Glasfiebermatrix. Das im S3-Puffer enthaltene chaotrope Salz denaturiert Proteine in der Lösung und erhöht die Bindungsaffinität der DNA an die Säule (Marko et al., 1982; Vogelstein & Gillespie, 1979). Eventuell noch vorhandene Salze oder andere Kontaminationen werden durch einen alkoholhaltigen Puffer von der Säule gewaschen und die DNA (nach Trocknung der Säule durch eine kurze Zentrifugation) mit TE-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O von der Säule eluiert.

**Tab. 4.4: Im Präparationskit "GFX Micro Plasmid Prep Kit" enthaltene Lösungen**

S1	Suspension	100 mM Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM EDTA 400 µg/mL RNase I
S2	Lyse	0,2 M NaOH 1% SDS
S3	Neutralisation	Enthält Acetat und ein chaotropes Salz <sup>1</sup>
Wash	buffer	Tris-EDTA Puffer mit 80% EtOH <sup>1</sup>

#### 4.2.2.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA mit "NucleoBond AX 100" (Macherey-Nagel)

Das "NucleoBond AX 100" der Firma Macherey-Nagel wurde zur Extraktion von Plasmid-DNA aus 100 mL-Übernachtskulturen verwendet.

**Tab. 4.5: Im Präparationskit "Nucleobond AX 100" enthaltene Lösungen**

S1	Suspension	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg/µL RNase A, pH 8.0	N3	Waschen	100 mM Tris 15% Ethanol 1.15 M KCl pH 6.3 (mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> eingestellt)
S2	Lyse	0,2 M NaOH 1% SDS	N5	Elution	100 mM Tris 15% Ethanol 1 M KCl pH 6.3 (mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> eingestellt)
S3	Neutralisation	2.8 M KAc, pH 5.1			
N2	Equilibrierung	100 mM Tris 15% Ethanol 0,9 M KCl 0.15% Triton X-100 pH 6.3 (mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> eingestellt)			

<sup>1</sup> keine näheren Herstellerangaben

### 4.2.3 Modifikation von Plasmid-DNA

#### 4.2.3.1 Restriktionsverdau

Die endonukleolytische Spaltung von Plasmid-DNA wurde wie von (Mülhardt, 2006) beschrieben, durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen (Puffer, Inkubationstemperatur und -dauer) wurden nach den Angaben der Hersteller (New England Biolabs (NEB), Fermentas, Promega) gewählt. Die vollständige Spaltung der Plasmid-DNA wurde durch elektrophoretische Auftrennung über ein Agarosegel überprüft. Sollte die DNA als Template für eine *in vitro*-Transkription (siehe 4.2.5) verwendet werden, wurde sie mit Proteinase K behandelt und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Alkoholfällung gereinigt.

#### 4.2.3.2 Ligation

Bei der Ligation doppelsträngiger DNA wird der Vektor in einer Konzentration von 3 bis 5 pmol/mL und das Insert im molaren Verhältnis 3:1 bis 9:1 (bei sehr kurzen Fragmenten bis 40:1) eingesetzt. Werden kohäsive DNA-Enden ligiert, reichen 0,5 bis 1,0 Units Ligase aus, während die Konzentration der Ligase bei DNA-Enden ohne Überhang ("*Blunt Ends*") auf etwa 5 Units erhöht werden sollte. Dabei ist aber zu beachten, dass die Ligase autoinhibitorisch ist. Die Ligationsansätze wurden 16 Stunden bei 4 °C inkubiert. Da Ligase die Effizienz der Transformation hemmt, wurde sie vor der Transformation in kompetente Bakterienzellen (siehe 4.1.5) durch Inkubation bei 65 °C für 10 min inaktiviert.

**Tab. 4.6: Beispiel für einen Ligationsansatz**

x	μL	Vektor
y	μL	Fragment
1,0	μL	10x T4 DNA Ligase Puffer
1,0	μL	ATP (5 mM)
0,5-5,0	Units	T4 DNA Ligase
ddH <sub>2</sub> O ad 10 μL		

#### 4.2.3.3 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Werden Vektoren mit Restriktionsenzymen geschnitten, hinterlassen diese einen Phosphatrest am 5'-Ende der Plasmid-DNA. Um die Wahrscheinlichkeit der Rückligation des Vektors zu verringern, wird mittels *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP, Roche) der Phosphatrest am 5'-Ende der Vektor-DNA entfernt. Die Phosphatase wurde nach Herstellerangaben verwendet und anschließend hitzeinaktiviert (15 min, 65 °C).

#### 4.2.3.4 Auffüllen von 5'-Überhängen mit DNA Polymerase I (Klenow-Fragment)

Nach Restriktionsverdau wurden bei einigen Fragmenten mit Hilfe des Klenow-Fragments die 5'-Überhänge aufgefüllt. Dazu wurde 1 Unit DNA Polymerase I (NEB) pro 1 μg DNA in Restriktionspuffer mit 100 μM dNTPs für 20 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde das gewünschte Fragment über ein präparatives Agarosegel (siehe 4.2.6) aufgereinigt.



#### 4.2.3.5 Glätten von 3'-Überhängen durch T4 DNA Polymerase

Einige der verwendeten Restriktionsenzyme hinterlassen einen 3'-Überhang, der durch T4 DNA Polymerase entfernt wurde. Dazu wurde 1 Unit T4 DNA Polymerase pro  $\mu\text{g}$  DNA in Restriktionspuffer mit 100  $\mu\text{M}$  dNTPs für 20 min bei 12 °C inkubiert. Das gewünschte Fragment wurde sofort im Anschluss über ein präparatives Agarosegel (siehe 4.2.6) aufgereinigt.

#### 4.2.4 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

##### 4.2.4.1 Proteinase K-Verdau

Proteinase K baut Proteine ab und wurde hier zur Reinigung der Template-DNA für die *in vitro*-Transkription verwendet. Dazu wurden 100  $\mu\text{L}$  Restriktionsverdau mit 20  $\mu\text{g}$  Proteinase K (Merck), 2 mM  $\text{CaCl}_2$  und 50 mM Tris-Cl, pH 7.5 für 30 min bis 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Proteinase wurde anschließend mit Phenol-Chloroform-Extraktion aus dem Ansatz entfernt.

##### 4.2.4.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zu dem Reaktionsansatz wird 1/2 Volumen Phenol und 1/2 Volumen Chloroform pipettiert, gut gemischt und zentrifugiert (10.000 x g, 2 min, RT). Die obere, wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch anschließende Alkoholfällung die in der Lösung evtl. verbliebenen Phenolreste entfernt.

##### 4.2.4.3 Alkoholfällung

Zur Fällung von DNA (z.B. als Template für die *in vitro*-Transkription) wird die Nukleinsäure-Lösung mit Natriumazetat in einer Endkonzentration von 0,3 M und dem 2,5-fachen Volumen 99% EtOH versetzt und gut durchmischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis (bzw. bis drei Stunden bei -20 °C bei geringen DNA-Mengen) wurde zentrifugiert (10.000 x g, 30 min, 4 °C), der Überstand abgenommen und das Pellet zwei Mal mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung wurde das DNA-Pellet in einem adäquaten Volumen  $\text{ddH}_2\text{O}$  aufgenommen.

##### 4.2.4.4 Fällung von RNA mit Ammoniumacetat

*In vitro*-transkribierte RNA wurde für einige Versuche mit einem Poly(A)-Schwanz versehen und musste vor dieser Polyadenylierung von den zuvor verwendeten Nukleotiden und dem Puffer der Capping-Reaktion abgetrennt werden. Dazu wurde die Nukleinsäure-Lösung mit 1 Volumen 5 M Ammoniumazetat gemischt und auf Eis für 30 bis 60 min inkubiert. Nach Zentrifugation (10.000 x g, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet zwei Mal mit 70%-igem Ethanol gewaschen.

## 4.2.5 RNA-Synthese *in vitro*

### 4.2.5.1 *In vitro*-Transkription

Um Durchlese-Transkripte zu verhindern, wurde die Plasmid-DNA hinter dem Stopp-Codon des zweiten Reportergens linearisiert, d.h. mit einem Restriktionsenzym geschnitten. Diese Template-DNA wurde Proteinase K-behandelt, einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen und nach Alkoholfällung so in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, dass sie in einer Endkonzentration von 0,5 µg/µL vorlag. Die Plasmide beinhalten eine Erkennungsstelle entweder für SP6-RNA-Polymerase oder für T7-RNA-Polymerase. Die Reaktion wurde für 60 min. bei 37 °C inkubiert.

**Tab. 4.7: Beispiel für einen Transkriptionsansatz**

rNTPs	500 µM
5x RNA Polymerase Puffer	
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
RNA Polymerase (SP6 oder T7)	1 U/µL
Template-DNA	
ddH <sub>2</sub> O	

### 4.2.5.2 *In vitro*-Transkription mit Cap-Nukleotid und Poly(A)-Schwanz

Die Synthese gecappter, polyadenylierter RNAs erfolgte in mehreren Schritten. Der erste Schritt ähnelt der oben beschriebenen *in vitro*-Transkription, jedoch wurde die Konzentration des rGTP auf 50 µM herabgesetzt und ein Cap-Analog (m7GpppG, Promega) mit einer Endkonzentration von 500 µM eingesetzt. Die Reaktion wurde 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels Ammoniumazetat-Fällung gereinigt. Zur Polyadenylierung wurde die RNA mit Poly(A) Polymerase (1 U/µL, usb) und ATP für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Polyadenylierung wurde (wie auch alle Zwischenschritte) per Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert.

## 4.2.6 Gel-Elektrophorese von Nukleinsäuren

Um Menge und Integrität bei DNA- und RNA-Präparationen abzuschätzen und für die Aufreinigung von Fragmenten für die Klonierung, wurden 1,5%-ige Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 220 mA (150 mA bei präparativen Gelen) für etwa 15 bis 20 min (60 min). Nach Färbung mit Ethidiumbromid wurden die DNA- bzw. RNA-Banden unter UV-Licht (Transilluminator, Herolab) sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Kamera fotografiert. Bei der präparativen Gel-Elektrophorese wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und die DNA mittels "GFX PCR DNA und Gel Band Purification Kit" (Amersham Biosciences) aus dem Agarosegel eluiert. Die Funktionsweise dieses Kits entspricht der in Kapitel 4.2.2.1 für Mini-Plasmid-Präparationen beschriebenen.

### 4.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) wurden aus den dicistronischen Plasmiden "kurze" Templates für die *in vitro*-Transkription generiert. Diesen Templates fehlt der zweite Reporter Fluc (Firefly Luziferase).

**Tab. 4.8: Oligonukleotide für die Generierung "kurzer" Templates**

Name	Sequenz
CMV_for	TGT GAA ATA CCG CAC AGA TG
PV_rev	AAA TTG TAC TTA GAG TAA ACA CAC
FMDV_rev	CAT GTG TTC AGT GGT TAT AAA AG

In analytischen (Gradienten-)PCRs wurden optimale Annealing-Temperatur und Konzentration der Magnesium-Ionen bestimmt: Für die Herstellung "kurzer" FMDV-Templates war eine Annealing-Temperatur von 57 °C, für die Herstellung der "kurzen" PV-Templates hingegen eine Annealing-Temperatur von 52 °C am besten geeignet.

**Tab. 4.9: Beispiel für einen PCR-Ansatz**

ddH <sub>2</sub> O	
10x <i>Taq</i> Polymerase Puffer	1x
MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM
dNTPs	0,25 mM
Forward-Primer	0,5 µM
Reverse-Primer	0,5 µM
Template-DNA	0,1 µg/µL
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,1 U/µL

## 4.3 Proteinbiochemie

### 4.3.1 *In vitro*-Translation

*In vitro*-Translationen wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysat (Rabbit Reticulocyte Lysate, RRL, Promega) und in HeLa-Zellextrakt (B. Kastner, Göttingen) durchgeführt.

#### 4.3.1.1 *In vitro*-Translation in Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL)

RRL ist ein translationskompetenter Extrakt aus Retikulozyten (Vorläufer der Erythrozyten) des Kaninchens. Nach Zelllyse wird der Extrakt mit Micrococcus-Nuklease behandelt, um die endogene mRNA zu zerstören, so dass nur noch die im Translationsansatz zugegebene RNA exprimiert wird. Das Lysat enthält alle für die Proteinsynthese notwendigen Zellbestandteile.

**Tab. 4.10: Beispiel für einen Translationsansatz in RRL**

ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µL	
RRL	8,8 µL	(enthält 50 mM KCl)
RNA	2,0 µL	100 ng/µL
<sup>35</sup> S-Methionin	0,2 µL	15 mCi/mL
KCl	bis 4,4 µL	0,5 M (addiert bis zu 110 mM KCl)

Die Translationsreaktion wurde für 60 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze kurz zentrifugiert und bis zur Messung der Reporterproteine auf Eis aufbewahrt. Ein Teil des Ansatzes wurde über SDS-PAGE (siehe 4.3.2) aufgetrennt, das Gel getrocknet und autoradiographiert (siehe 4.3.4). Ein weiterer Teil des Ansatzes wurde verwendet, um die Expression der Reportergene zu messen (siehe 4.3.5)

#### 4.3.1.2 *In vitro*-Translation in HeLa-Zellextrakt

HeLa-Extrakt für *in vitro*-Translationen wurde freundlicherweise von B. Kastner, Göttingen zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um einen unbehandelten, cytoplasmatischen, translationskompetenten Zellextrakt nach (Bergamini et al., 2000).

#### 4.3.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Nach der *in vitro*-Translation wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (nach Lämmli, 1970) in einem 12%-Gel aufgetrennt, das Gel getrocknet und eine Autoradiographie durchgeführt.

#### 4.3.3 Western Blot

Dieses Verfahren dient der Übertragung von Proteinen nach Auftrennung mittels Elektrophorese auf eine Membran. Der Transfer der Proteine erfolgte hier nach dem *Semi-dry*-Verfahren auf Nitrocellulose-Membranen mit 1,2 mA/cm<sup>2</sup> für 120 min (Burnette, 1981).

Die Spaltung von eIF4G durch die L-Protease von FMDV wurde mit monoklonalem Anti-eIF4G-Antikörper (BD Transduction Laboratories), der den C-terminalen Teil des eIF4G erkennt, nachgewiesen. Als sekundärer Antikörper wurde ein gegen Maus-IgG gerichteter, mit HRP gekoppelter Antikörper verwendet. Die Antigen-Detektion erfolgte mit Hilfe des "Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Western Blotting Kit" (Roche). Das Prinzip der Detektion des Antigens ist die Umsetzung des Substrats Luminol durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase, wobei Licht freigesetzt wird. Die so behandelte Membran wurde unter Rotlicht auf einen Röntgenfilm aufgelegt, wobei verschiedene Expositionszeiten gewählt wurden. Anschließend wurde der Röntgenfilm entwickelt und fixiert.

Zur Spaltung des endogen vorhandenen eIF4G wurden 100 µL RRL mit der für die L-Protease von FMDV kodierenden RNA für 45 min bei 37 °C inkubiert und – zusammen mit einer unbehandelten Kontrolle – mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Das RRL mit gespaltenem eIF4G wurde für *in vitro*-Translationen verwendet (siehe 4.3.1).

**Tab. 4.11: Verwendete Antikörper für den Nachweis der Spaltung von eIF4G**

Name	Isotyp	Hersteller	Kommentar
Anti-eIF4G	Maus IgG1	BD Transduction Laboratories	
Anti-mouse IgG		DakoCytomation	Konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (Horseradish peroxidase, HRP)

#### 4.3.4 Autoradiographie

Wurde in den *in vitro*-Translationen <sup>35</sup>S-Methionin eingesetzt, wurden die Gele nach Trocknung auf einem Röntgenfilm (Kodak) für etwa 24 Stunden bei Raumtemperatur exponiert und anschließend entwickelt.

### 4.3.5 Nachweis der Expression von Reportergenen

#### 4.3.5.1 Präparation von Zellextrakten zur Messung der Reporter-Expression

Die Zellen wurden vier Stunden nach Transfektion zwei Mal mit PBS gewaschen und mit 150 µL Lysispuffer (PLB, Passive Lysis Buffer, Promega) pro Well lysiert (5 min bei Raumtemperatur). Sollte das Zellextrakt für den Nachweis von Chloramphenicol-Acetyltransferase verwendet werden, wurden die Zellen mit 150 µL Reporter Lysis Buffer (RLB, Promega) lysiert. Anschließend wurde das Zelllysate in Reaktionsgefäße pipettiert und bei 650 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die Messungen der Reporter-Expression verwendet. Für die Nachweise von beta-Galaktosidase, Firefly und *Renilla* Luziferase wurde ein Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold) verwendet.

#### 4.3.5.2 Nachweis der Expression von Firefly Luziferase (Fluc)

Die Sequenz des Firefly-Luziferase-Gens in den beschriebenen Plasmiden entspricht der Sequenz des Luziferase-Gens des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*. Diese Luziferase katalysiert, in Anwesenheit von ATP,  $Mg^{2+}$  und Coenzym A, die Oxidation von D-Luziferin zu Oxiluziferin. Durch die Oxidation des D-Luciferins zu Oxiluciferin werden Photonen freigesetzt, die mit einer Wellenlänge von 560 nm im Luminometer gemessen werden können (de Wet et al., 1987).

**Tab. 4.12: Substrat und Puffer für die Messung von Firefly Luziferase**

Fluc-Substrat (pH 7.8)			Fluc-Puffer (pH 7.8)		
Tricine	20	mM	Glycylglycin pH 7.8	25	mM
(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	1,07	mM	MgSO <sub>4</sub>	15	mM
MgSO <sub>4</sub>	2,67	mM	EDTA	0,1	mM
EDTA	0,1	mM	DTT	33,3	mM
DTT	33,3	mM	rATP	530	µM
Koenzyme A	270	µM			
Luziferin ( <i>Photinus pyralis</i> )	470	µM			
rATP	530	µM			

Für eine Messung wurden zu 20 µL Zelllysate bzw. 4 µL Zellextrakt aus *in vitro*-Translationsansätzen 100 µL Fluc-Substrat (1:5 mit Puffer verdünnt) injiziert und die Lichtemission 20 Sekunden gemessen.

#### 4.3.5.3 Nachweis von *Renilla* Luziferase (Rluc)

Die Sequenz des *Renilla*-Luziferase-Gens in den beschriebenen Plasmiden entspricht der Sequenz des Luziferase-Gens der Koralle *Renilla reniformis*. Durch die *Renilla* Luziferase wird die Umsetzung des Substrats Coelenterazine zu Coelenteramide und Licht katalysiert.

**Tab. 4.13: Substrat und Puffer für die Messung von *Renilla* Luziferase**

Rluc-Substrat	Rluc-Puffer (pH 7.4)		
Coelenterazine (Fa. Synchem, Kassel) in Methanol (Endkonzentration 0,5 µg/µL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1	M
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	M
	EDTA	0,5	M
	NaCl	1	mM

Für eine Messung wurden zu 20 µL Zellextrakt bzw. 5 µL Extrakt aus *in vitro*-Translationsansätzen 100 µL Rluc-Substrat (1:100 mit Puffer verdünnt) injiziert und die Lichtemission 20 Sekunden lang gemessen.

#### 4.3.5.4 Nachweis von beta-Galactosidase (beta-Gal)

Beta-Galaktosidase RNA (pcDNA4/HisMax/lacZ) wurde in die Zellen kotransfiziert, um die Werte für CAT, Rluc und Fluc normalisieren zu können. Die Expression von beta-Galaktosidase wurde mit dem "beta-Gal Reporter Gene Assay, chemiluminiszent" der Firma Roche nachgewiesen. Dabei wird das Substrat "Galacton Plus" durch die enzymatische Aktivität der im Zellextrakt vorhandenen beta-Galaktosidase deglykosyliert. Dieser Inkubationsschritt wird bei pH 7.8 durchgeführt, so dass das entstehende Zwischenprodukt (Dioxetan) protoniert vorliegt und kein Lichtsignal aussenden kann. Durch Zugabe des Initiationsreagenz wird der pH-Wert über pH 12.0 erhöht, das Intermediat wird deprotoniert und zerfällt unter Lichtemission mit einer Wellenlänge von 475 nm.

#### 4.3.5.5 Nachweis von Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)

Chloramphenicol-Acetyltransferase katalysiert die Übertragung eines Acylrestes von Acetyl-CoA auf Chloramphenicol. Zur Messung der Enzymaktivität wurde das Zelllysate für 10 min bei 60 °C inkubiert, um endogene Acetyltransferasen zu inaktivieren. Die durch das Reportergen in der Zelle exprimierte *E. coli* Chloramphenicol-Acetyltransferase ist hitzestabil. Anschließend wurden 5 bis 15 µL Zelllysate (oder bei Nachweis von CAT aus *in vitro*-Translationen 5 µL Zellextrakt) mit Tris-Cl, Chloramphenicol und <sup>14</sup>C-markiertem Acetyl-CoA für 30 bis 60 min bei 37 °C inkubiert. Bei der nachfolgenden Xylol-Extraktion verbleibt nicht umgesetztes <sup>14</sup>C-Acetyl-CoA in der unteren Phase. Die obere (Xylol-)Phase wurde abgenommen, in ein Szintillations-Röhrchen pipettiert und mit 1,5 mL Szintillations-Flüssigkeit (Roth) gemischt. Die Proben wurden in einem Szintillations-Zähler gezählt.

**Tab 4.14: Beispiel für einen Reaktionsansatz des CAT-Assays**

x	µL	Zellextrakt
39,0 – x	µL	0,25 M Tris-Cl (pH 8,0)
0,52	µL	Chloramphenicol (25 mg/mL) (Endkonzentration 1 mM)
0,20	µL	<sup>14</sup> C-Acetyl-CoA (Endkonzentration 5 µM)

Mit x = 5 bis 15 µL Zellextrakt

## 4.4 Zellkultur

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden in einem S2-Labor unter einer Sterilbank ausgeführt.

### 4.4.1 Verwendete eukaryotische Zellen

Für die Transfektion dicistronischer FMDV-Konstrukte wurden Nierenzellen des Syrischen Hamsters (BHK21-Zellen) verwendet. *In vivo*-Experimente mit dicistronischen PV-Konstrukten wurden in HeLa-Zellen durchgeführt. Beide Zelllinien wurden von der European Collection of Cell Cultures (ECACC) bezogen.

### 4.4.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

HeLa- und BHK21-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) mit L-Glucose (4.500 mg/L), L-Glutamin, 10% (v/v) Fötalem Kälberserum (fetale bovine serum, FBS) und 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (Gibco) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in sterilen Kulturflaschen (Greiner) in einem Inkubator kultiviert. Eine Kontrolle der Zellen erfolgte mikroskopisch; bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen passagiert, für *in vivo*-Translationsexperimente in Zellkulturplatten gesplittet oder für die Lagerung in Flüssigstickstoff vorbereitet und eingefroren.

### 4.4.3 Transfektion von RNA

Für *in vivo*-Translationsexperimente wurden 80-90% konfluente Zellen 24 Stunden vor Transfektion in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen (Greiner) ausgesät. Vor der Transfektion der RNA wurden die Zellen mikroskopisch kontrolliert; sie sollen vor Beginn des Versuchs eine Konfluenz von etwa 90% aufweisen. Die Transfektion der *in vitro*-transkribierten RNAs (siehe 4.2.5) wurde mit dem "TransMessenger<sup>TM</sup> Transfection Reagent Kit" der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und basiert auf dem Prinzip der Lipofektion (Felgner et al., 1987). Vier Stunden nach Transkription wurden die Zellen lysiert und die Expression der Reportergene wie in Kapitel 4.3.5 beschrieben bestimmt.

### 4.4.4 Extraktion cytoplasmatischer RNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Extraktion cytoplasmatischer RNA wurde das "RNeasy Mini Kit" von Qiagen verwendet. Die Funktionsweise dieses Kits gleicht der in Abschnitt 4.2.2 (Präparation von Plasmid-DNA) beschriebenen.

**Tab. 4.15: Puffer für die Extraktion cytoplasmatischer RNA ("RNeasy Mini Kit" von Qiagen)**

RLN-Puffer	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	140 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
	Nonidet P-40 (1,06 g/L)	0,5% (v/v)
RLT-Puffer	enthält Guanidinium Thiocyanat*	
RW1-Puffer	enthält Ethanol*	
RPE-Puffer	enthält Ethanol*	

\* keine weiteren Herstellerangaben

Die Lyse der Zellmembranen erfolgte mit selbst angesetzttem RLN-Puffer, alle anderen Puffer sind in dem Kit enthalten. Vier Stunden nach Transfektion wurden die eukaryotischen Zellen mit RLN-Puffer lysiert, das Lysat für 5 min mit 300 x g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand wurde RLT-Puffer gegeben und gut durchmischt. Anschließend wurde die Lösung mit 99% (v/v) Ethanol gemischt und auf eine Säule gegeben. Nach Zentrifugation (13.000 x g, 1 min, RT) wurde auf die Säule RW1-Puffer gegeben und erneut zentrifugiert. Die Säule wurde dann mit RPE-Puffer gewaschen und nach einer kurzen Zentrifugation wurde die RNA mit 30 bis 50 µL ddH<sub>2</sub>O von der Säule eluiert.

#### 4.5 Lösungen für die Molekularbiologie und die Proteinbiochemie

Ergänzend zu den in dieser Arbeit gemachten Angaben über molekularbiologische und proteinchemische Methoden und Lösungen können weitere Hinweise und Rezepturen der Literatur entnommen werden (Mülhardt, 2006, Rehm, 2006, Sambrook et al., 2001).

1,5%-Agarose	0,6 g	Agarose
	80 mL	E-Puffer
Coomassie-Färbelösung	50%	Ethanol
	10%	Essigsäure
	0,12%	Coomassie Brilliant Blue R250
Coomassie-Entfärbelösung	7,2%	Essigsäure
	5%	Ethanol
DNA-Probenpuffer	75% (v/v)	Glyzerin
	2 mg/mL	Bromphenolblau
	4 mg/mL	Xylencyanol
	50 mM	EDTA
E-Puffer (= TAE-Puffer)	40 mM	Tris
	40 mM	Natriumazetat
	2 mM	EDTA
		pH 8,3 (mit Essigsäure einstellen)
PBS	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	4,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
RC (Researchers Cocktail)	2 cL	Blue Curaçao
	2 cL	Wodka
	1-2 Tr	Japanisches Heilpflanzenöl
	8 cL	Orangensaft
		Mit einem kleinen Stück Trockeneis servieren.
Sammelgel-Puffer	125 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	0,1%	SDS
TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH 8.0
	0,1 mM	EDTA
Trenngel-Puffer	375 mM	Tris-HCl, pH 8,8
	0,1%	SDS
Tris-Glycin-Puffer (Lämmli-Puffer)	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,1%	SDS



**4.6 Verzeichnis der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien**

CO <sub>2</sub> -Inkubator Serie CB	Binder, Tuttlingen
Sterilbank "Hera Safe"	Heraeus, Hanau
Reaktionsgefäße	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Polaroid-Filme "667 Professional"	Polaroid Corporation, Cambridge, MA, USA
Röntgenfilme "Kodak X-omat XAR5"	Eastman Kodak, Rochester, NY, USA
Röntgenfilmentwickler "Cronex MD-Developer"	DuPont, Bad Homburg
Röntgenfilmfixierer "Cronex MF-E Fixer"	DuPont, Bad Homburg
Nitrilhandschuhe	Ansell
Luminometerröhrchen	Sarstedt
Pipetten für die Zellkultur	Becton Dickinson Labware, USA
Sterilfilter	Milipore
Luminometer "Lumat LB 9507"	Berthold
PCR Robocycler	Stratagene, Kalifornien
Filmkassetten "Cronex Lightning Plus"	DuPont, Boston
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-one, Essen
Zellkulturplatten	Sarstedt
Kühlzentrifuge	Beckman Instruments, Summerset, USA
Tischzentrifuge "Biofuge fresco"	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf
Szintillations-Zähler	Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 1500, Firma Packard, Canberra, Australien

## 5. Literaturverzeichnis

- Agol, V. A. (2002). Picornavirus Genome: an Overview. In *Molecular Biology of Picornaviruses*, pp. 127-148. Edited by B. L. Semler & E. Wimmer. Washington, DC: ASM Press.
- Andino, R., Rieckhof, G. E., Achacoso, P. L. & Baltimore, D. (1993). Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J.* 12, 3587-3598.
- Baird, S. D., Turcotte, M., Korneluk, R. G. & Holcik, M. (2006). Searching for IRES. *RNA* 12, 1755-1785.
- Bassili, G. (2003). Charakterisierung einer konservierten Region in der Internen Ribosomen-Eintrittsstelle der RNA des Maul- und Klauenseuche-Virus. Dissertation, Universität Gießen.
- Bassili, G., Tzima, E., Song, Y., Saleh, L., Ochs, K. & Niepmann, M. (2004). Sequence and secondary structure requirements in a highly conserved element for foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site activity and eIF4G binding. *J. Gen. Virol.* 85, 2555-2565.
- Beck, E. & Strohmaier, K. (1987). Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.* 61, 1621-1629.
- Bergamini, G., Preiss, T. & Hentze, M. W. (2000). Picornavirus IRESes and the poly(A) tail jointly promote cap- independent translation in a mammalian cell-free system. *RNA* 6, 1781-1790.
- Bonnal, S., Boutonnet, C., Prado-Lourenco, L. & Vagner, S. (2003). IRESdb: the Internal Ribosome Entry Site database. *Nucleic Acids Res.* 31, 427-428.
- Borman, A. M., Bailly, J. L., Girard, M. & Kean, K. M. (1995). Picornavirus internal ribosome entry segments: comparison of translation efficiency and the requirements for optimal internal initiation of translation in vitro. *Nucleic Acids Res.* 23, 3656-3663.
- Borman, A. & Jackson, R. J. (1992). Initiation of translation of human rhinovirus RNA: mapping the internal ribosome entry site. *Virology* 188, 685-696.
- Borman, A. M., Kirchweiger, R., Ziegler, E., Rhoads, R. E., Skern, T. & Kean, K. M. (1997). eIF4G and its proteolytic cleavage products: effect on initiation of protein synthesis from capped, uncapped, and IRES-containing mRNAs. *RNA* 3, 186-196.
- Borman, A. M., Le Mercier, P., Girard, M. & Kean, K. M. (1997). Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res.* 25, 925-932.
- Bradrick, S. S., Walters, R. W. & Gromeier, M. (2006). The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase. *Nucleic Acids Res.* 34, 1293-1303.
- Brown, E. A., Zhang, H., Ping, L. H. & Lemon, S. M. (1992). Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res.* 20, 5041-5045.
- Buratti, E., Tisminetzky, S., Zotti, M. & Baralle, F. E. (1998). Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3. *Nucleic Acids Res.* 26, 3179-3187.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.
- Cevallos, R. C. & Sarnow, P. (2005). Factor-independent assembly of elongation-competent ribosomes by an internal ribosome entry site located in an RNA virus that infects penaeid shrimp. *J. Virol.* 79, 677-683.
- Chang, J., Nicolas, E., Marks, D., Sander, C., Lerro, A., Buendia, M. A., Xu, C., Mason, W. S., Moloshok, T., Bort, R., Zaret, K. S. & Taylor, J. M. (2004). miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol.* 1, 106-113.
- Chazal, N. & Gerlier, D. (2003). Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 226-237, table of contents.
- De Felipe, P. (2002). Polycistronic viral vectors. *Curr Gene Ther* 2, 355-378.
- De Gregorio, E., Preiss, T. & Hentze, M. W. (1998). Translational activation of uncapped mRNAs by the central part of human eIF4G is 5' end-dependent. *RNA* 4, 828-836.

- Dildine, S. L., Stark, K. R., Haller, A. A. & Semler, B. L. (1991). Poliovirus translation initiation: differential effects of directed and selected mutations in the 5' noncoding region of viral RNAs. *Virology* 182, 742-752.
- Douin, V., Bornes, S., Creancier, L., Rochaix, P., Favre, G., Prats, A. C. & Couderc, B. (2004). Use and comparison of different internal ribosomal entry sites (IRES) in tricistronic retroviral vectors. *BMC Biotechnol* 4, 16.
- Fang, J. W. & Moyer, R. W. (2000). The effects of the conserved extreme 3' end sequence of hepatitis C virus (HCV) RNA on the in vitro stabilization and translation of the HCV RNA genome. *J. Hepatol.* 33, 632-639.
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R. & Skalka, A. M. (2004). In *Principles of Virology*. Washington, D.C.: ASM-Press.
- Franco, D., Pathak, H. B., Cameron, C. E., Rombaut, B., Wimmer, E. & Paul, A. V. (2005). Stimulation of poliovirus RNA synthesis and virus maturation in a HeLa cell-free in vitro translation-RNA replication system by viral protein 3CDpro. *Virol J* 2, 86.
- Friebe, P. & Bartenschlager, R. (2002). Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J. Virol.* 76, 5326-5338.
- Fu, H., Tie, Y., Xu, C., Zhang, Z., Zhu, J., Shi, Y., Jiang, H., Sun, Z. & Zheng, X. (2005). Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method. *FEBS Lett.* 579, 3849-3854.
- Gamarnik, A. V. & Andino, R. (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* 12, 2293-2304.
- Garneau, N. L., Wilusz, J. & Wilusz, C. J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 113-126.
- Geering, W. A. & Lubroth, J. (1996). Preparation of Foot-and-Mouth Disease Contingency Plans. In *FAO Animal Health Manual No. 16*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Gingras, A. C., Raught, B. & Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 913-963.
- He, L. & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5, 522-531.
- Hellen, C. U. & Sarnow, P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 15, 1593-1612.
- Hershey, J. W. B. & Merrick, W. C. (2000). Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In *Translational control of gene expression*, pp. 33-88. Edited by N. Sonenberg, J. W. B. Hershey & M. B. Mathews. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Higa, T., Tanaka, J., Tsukitani, Y. & Kikuchi, H. (1981). Hippuristanols, cytotoxic polyoxygenated steroids from the gorgonian *Isis hippuris*. *Chem. Lett. (Jpn.)* 11, 1647-1650.
- Imataka, H., Gradi, A. & Sonenberg, N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.* 17, 7480-7489.
- Imbert, I., Dimitrova, M., Kien, F., Kieny, M. P. & Schuster, C. (2003). Hepatitis C virus IRES efficiency is unaffected by the genomic RNA 3'NTR even in the presence of viral structural or non-structural proteins. *J. Gen. Virol.* 84, 1549-1557.
- Ito, T. & Lai, M. M. C. (1999). An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence. *Virology* 254, 288-296.
- Ito, T., Tahara, S. M. & Lai, M. M. C. (1998). The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J. Virol.* 72, 8789-8796.
- IUBMB (1996). Prokaryotic and eukaryotic translation factors. *Ad Hoc Nomenclature Subcommittee Report. Biochimie* 78, 1119-1122.
- Jackson, R. J. (2000). Comparative view of initiation site selection mechanisms. In *Translational control of gene expression*, pp. 127-183. Edited by N. Sonenberg, J. W. B. Hershey & M. B. Mathews. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Jackson, R. J. (2002). Proteins involved in the function of picornavirus internal ribosomal entry sites. In *Molecular Biology of Picornaviruses*, pp. 171-183. Edited by B. L. Semler & E. Wimmer. Washington, DC: ASM Press.

- Jackson, R. J. (2005). Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1231-1241.
- Jackson, R. J. & Kaminski, A. (1995). Internal initiation of translation in eukaryotes: the picornavirus paradigm and beyond. *RNA* 1, 985-1000.
- Jang, S. K., Kräusslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C. & Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol.* 62, 2636-2643.
- Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. & Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309, 1577-1581.
- Jünemann, C., Song, Y., Bassili, G., Goergen, D., Henke, J. & Niepmann, M. (2007). Picornavirus internal ribosome entry site elements can stimulate translation of upstream genes. *J. Biol. Chem.* 282, 132-141.
- Knapinska, A. M., Irizarry-Barreto, P., Adusumalli, S., Androulakis, I., Brewer, G. (2005). Molecular Mechanisms Regulating mRNA Stability: Physiological and Pathological Significance. *Current Genomics* 6, 471-486.
- Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pestova, T. V. & Hellen, C. U. (2003). Eukaryotic initiation factors 4G and 4A mediate conformational changes downstream of the initiation codon of the encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site. *Mol. Cell. Biol.* 23, 687-698.
- Kong, L. K. & Sarnow, P. (2002). Cytoplasmic expression of mRNAs containing the internal ribosome entry site and 3' noncoding region of hepatitis C virus: effects of the 3' leader on mRNA translation and mRNA stability. *J. Virol.* 76, 12457-12462.
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283-292.
- Kren, B. T. & Steer, C. J. (1996). Posttranscriptional regulation of gene expression in liver regeneration: role of mRNA stability. *FASEB J.* 10, 559-573.
- Kühn, R., Luz, N. & Beck, E. (1990). Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 64, 4625-4631.
- Kuhn, R. J., Tada, H., Ypma Wong, M. F., Semler, B. L. & Wimmer, E. (1988). Mutational analysis of the genome-linked protein VPg of poliovirus. *J. Virol.* 62, 4207-4215.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12, 735-739.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamphear, B. J., Kirchweiger, R., Skern, T. & Rhoads, R. E. (1995). Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J. Biol. Chem.* 270, 21975-21983.
- Landsteiner, K. & Popper, E. (1909). Übertragung der Poliomyelitis acuta auf Affen. *Zeitschrift für Immunitätsforschung* II, 377-390.
- Lee, H., Shin, H., Wimmer, E. & Paul, A. V. (2004). cis-acting RNA signals in the NS5B C-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome. *J. Virol.* 78, 10865-10877.
- Loeffler, F. & Frosch, P. (1897). Summarischer Bericht über die Ergebnisse der Untersuchungen zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche. *Zentralbl. Bakteriologie* 22, 257.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285, 110-113.
- Lopez-Lastra, M., Rivas, A. & Barria, M. I. (2005). Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol. Res.* 38, 121-146.
- Martinez-Salas, E., Regalado, M. P. & Domingo, E. (1996). Identification of an essential region for internal initiation of translation in the aphthovirus internal ribosome entry site and implications for viral evolution. *J. Virol.* 70, 992-998.
- McCaffrey, A. P., Ohashi, K., Meuse, L., Shen, S., Lancaster, A. M., Lukavsky, P. J., Sarnow, P. & Kay, M. A. (2002). Determinants of hepatitis C translational initiation in vitro, in cultured cells and mice. *Mol. Ther.* 5, 676-684.
- Meyer, K., Petersen, A., Niepmann, M. & Beck, E. (1995). Interaction of eukaryotic initiation factor eIF-4B with a picornavirus internal translation initiation site. *J. Virol.* 69, 2819-2824.

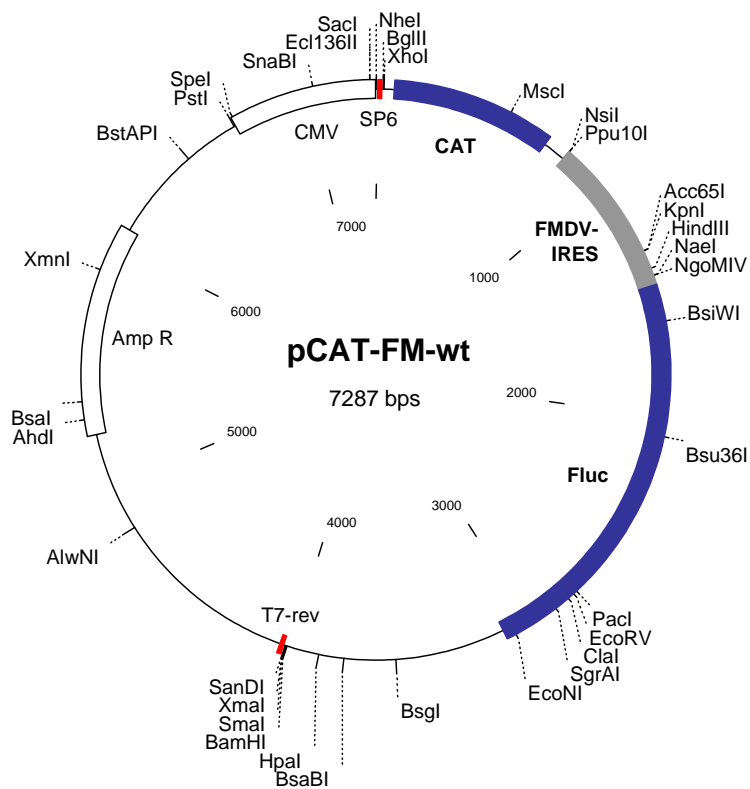
- Michel, Y. M., Borman, A. M., Paulous, S. & Kean, K. M. (2001). Eukaryotic initiation factor 4G-poly(A) binding protein interaction is required for poly(A) tail-mediated stimulation of picornavirus internal ribosome entry segment-driven translation but not for X-mediated stimulation of hepatitis C virus translation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4097-4109.
- Molla, A., Paul, A. V. & Wimmer, E. (1991). Cell-free, de novo synthesis of poliovirus. *Science* 254, 1647-1651.
- Morino, S., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Pestova, T. V. & Sonenberg, N. (2000). Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. *Mol. Cell. Biol.* 20, 468-477.
- Mülhardt, G. (2006). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. München: Elsevier GmbH.
- Mueller, S., Wimmer, E. & Cello, J. (2005). Poliovirus and poliomyelitis: a tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Res.* 111, 175-193.
- Murakami, K., Abe, M., Kageyama, T., Kamoshita, N. & Nomoto, A. (2001). Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. *Arch. Virol.* 146, 729-741.
- Niepmann, M. (1999). Internal initiation of translation of picornaviruses, hepatitis C virus and pestiviruses. *Recent Res. Devel. Virol.* 1, 229-250.
- Niepmann, M., Petersen, A., Meyer, K. & Beck, E. (1997). Functional involvement of polypyrimidine tract-binding protein in translation initiation complexes with the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 71, 8330-8339.
- Novac, O., Guenier, A. S. & Pelletier, J. (2004). Inhibitors of protein synthesis identified by a high throughput multiplexed translation screen. *Nucleic Acids Res.* 32, 902-915.
- Ochs, K., Rust, R. C. & Niepmann, M. (1999). Translation initiation factor eIF4B interacts with a picornavirus internal ribosome entry site in both 48S and 80S initiation complexes independently of initiator AUG location. *J. Virol.* 73, 7505-7514.
- Ochs, K., Saleh, L., Bassili, G., Sonntag, V. H., Zeller, A. & Niepmann, M. (2002). Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus internal ribosome entry site. *J. Virol.* 76, 2113-2122.
- Ochs, K., Zeller, A., Saleh, L., Bassili, G., Song, Y., Sonntag, A. & Niepmann, M. (2003). Impaired binding of standard initiation factors mediates poliovirus translation attenuation. *J. Virol.* 77, 115-122.
- Pain, V. M. (1996). Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* 236, 747-771.
- Pelletier, J., Kaplan, G., Racaniello, V. R. & Sonenberg, N. (1988). Translational efficiency of poliovirus mRNA: mapping inhibitory cis-acting elements within the 5' noncoding region. *J. Virol.* 62, 2219-2227.
- Pelletier, J. & Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320-325.
- Pestova, T. V., Borukhov, S. I. & Hellen, C. U. T. (1998). Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* 394, 854-859.
- Pestova, T. V., Hellen, C. U. & Shatsky, I. N. (1996a). Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6859-6869.
- Pestova, T. V. & Kolupaeva, V. G. (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev.* 16, 2906-2922.
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J. & Hellen, C. U. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev.* 12, 67-83.
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N. & Hellen, C. U. (1996b). Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6870-6878.
- Petersen, A. (1995). *Funktionale Analyse von RNA-Protein-Interaktionen an der internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) des Maul- und Klauenseuchevirus*. Dissertation. Deutschland: Universität Giessen.

- Pilipenko, E. V., Maslova, S. V., Sinyakov, A. N. & Agol, V. I. (1992). Towards identification of cis-acting elements involved in the replication of enterovirus and rhinovirus RNAs: a proposal for the existence of tRNA-like terminal structures. *Nucleic Acids Res.* 20, 1739-1745.
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N. & Filipowicz, W. (2007). Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* 17, 118-126.
- Pöyry, T., Kinnunen, L. & Hovi, T. (1992). Genetic variation in vivo and proposed functional domains of the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *J. Virol.* 66, 5313-5319.
- Poy, M. N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P. E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P. & Stoffel, M. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432, 226-230.
- Prevot, D., Darlix, J. L. & Ohlmann, T. (2003a). Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol. Cell* 95, 141-156.
- Prevot, D., Decimo, D., Herbreteau, C. H., Roux, F., Garin, J., Darlix, J. L. & Ohlmann, T. (2003b). Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *EMBO J.* 22, 1909-1921.
- Pyronnet, S. (2000). Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1237-1243.
- Reed, W., Agramonte, A. & Lazear, J. (1900). The etiology of yellow fever - a preliminary note. *Philadelphia med. J.* 148, 101.
- Rehm, H. (2006). *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. München: Elsevier GmbH.
- Rueckert, R. R. (1996). Picornaviridae: the viruses and their replication. In *Fundamental Virology*, 3 edn, pp. 477-522. Edited by B. N. Fields, Knipe, D. M., Howley, P. M. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams and Wilkins.
- Saleh, L., Rust, R. C., Fullkrug, R., Beck, E., Bassili, G., Ochs, K. & Niepmann, M. (2001). Functional interaction of translation initiation factor eIF4G with the foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site. *J. Gen. Virol.* 82, 757-763.
- Saiz, M., Nunez, J. I., Jimenez-Clavero, M. A., Baranowski, E. & Sobrino, F. (2002). Foot-and-mouth disease virus: biology and prospects for disease control. *Microbes Infect.* 4, 1183-1192.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sangar, D. V., Black, D. N., Rowlands, D. J. & Brown, F. (1977). Biochemical mapping of the foot-and-mouth disease virus genome. *J. Gen. Virol.* 35, 281-297.
- Song, Y. (2006). Regulation of Hepatitis C Virus translation by the viral internal ribosome entry and the 3'-untranslated region. Dissertation, Universität Giessen.
- Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Jünemann, C., Bartenschlager, R. & Niepmann, M. (2006). The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J. Virol.* 80, 11579-11588.
- Spahn, C. M., Kieft, J. S., Grassucci, R. A., Penczek, P. A., Zhou, K., Doudna, J. A. & Frank, J. (2001). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 291, 1959-1962.
- Svitkin, Y. V., Ovchinnikov, L. P., Dreyfuss, G. & Sonenberg, N. (1996). General RNA binding proteins render translation cap dependent. *EMBO J.* 15, 7147-7155.
- Tarun, S. Z., Jr. & Sachs, A. B. (1997). Binding of eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) to eIF4G represses translation of uncapped mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6876-6886.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. & Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 66, 1476-1483.
- Wang, C., Sarnow, P. & Siddiqui, A. (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J. Virol.* 67, 3338-3344.
- WHO and UNICEF, 2007. Eradicating polio. Monthly situation report, 3. April 2007. Online unter: <http://www.polioeradication.org/>, Stand 20. April 2007.
- Wilson, J. E., Powell, M. J., Hoover, S. E. & Sarnow, P. (2000). Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4990-4999.
- Xu, L., Shao, H., Wu, W., Cao, Z., Zhao, Z., Liu, H., Jiang, D., Mao, X. & Li, W. (2005). Co-expression of the complement regulatory proteins human DAF and CD59 with an IRES-

- mediated dicistronic mammalian vector enhances their cell protective effects. *Int J Mol Med* 16, 409-414.
- Yenofsky, R. L., Fine, M. & Pellow, J. W. (1990). A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3435-3439.
- Yi, M., Bodola, F. & Lemon, S. M. (2002). Subgenomic hepatitis C virus replicons inducing expression of a secreted enzymatic reporter protein. *Virology* 304, 197-210.
- Yi, M. & Lemon, S. M. (2003). 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 77, 3557-3568.

**pCAT-FM-wt (7287 bps)**

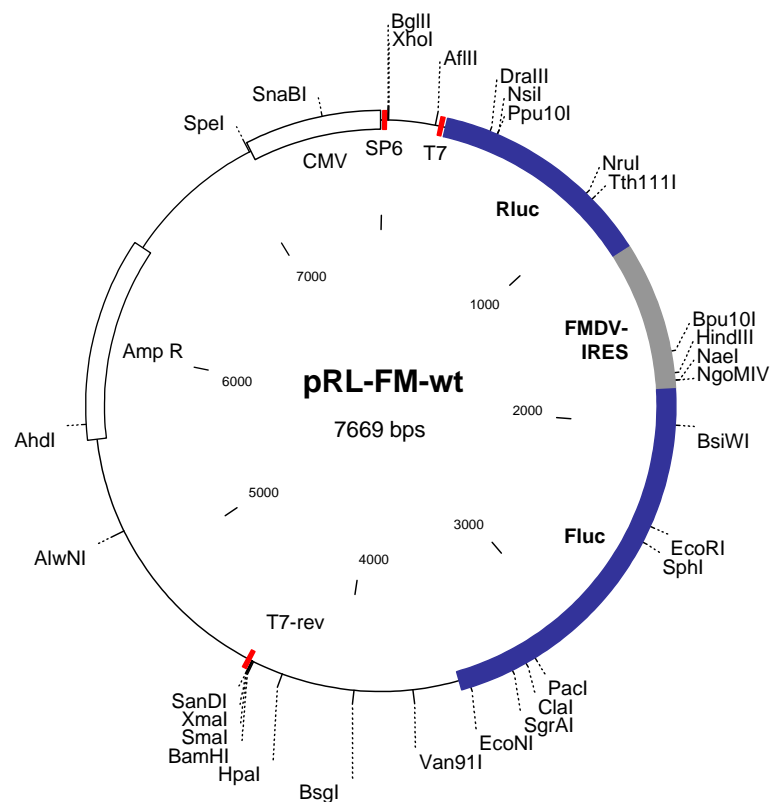
Name	Start	Ende	Beschreibung
SP6	8	24	Erkennungssequenz der SP6-Polymerase
CAT	75	735	Reportergen Chloramphenicol-Acetyltransferase
FMDV-IRES	829	1459	FMDV-IRES (Wildtyp), 11. AUG direkt vor Beginn Firefly Luziferase-Reportergen
Fluc	1460	3108	Reportergen Firefly Luziferase
T7-rev	4025	4041	Erkennungssequenz der T7-Polymerase auf dem Gegenstrang
Amp R	5220	6080	Kodierende Sequenz für beta-Laktamase (Ampicillin-Resistenz)
CMV	6691	7286	Entspricht 147-742 aus "hCMV major immediate-early gene, enhancer" (K03104, NCBI)





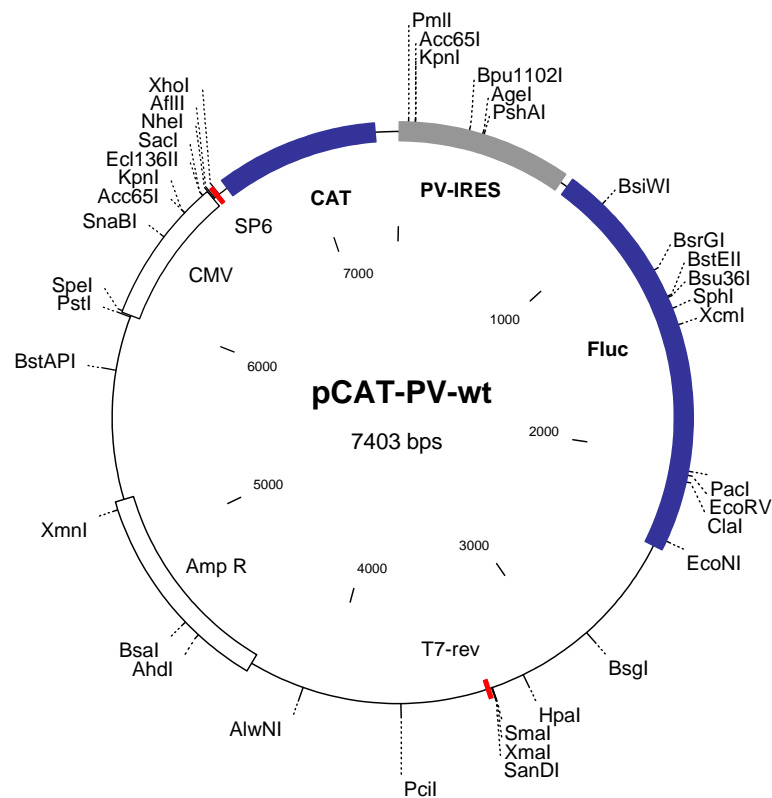
**pRL-FM-wt (7669 bps)**

Name	Start	Ende	Beschreibung
SP6	8	24	Erkennungssequenz der SP6-Polymerase
T7	251	267	Erkennungssequenz der T7-Polymerase
Rluc	279	1220	Reportergen <i>Renilla</i> Luziferase
FMDV-IRES	1224	1846	FMDV-IRES (Wildtyp), 11. AUG direkt vor Beginn Firefly Luziferase-Reportergen
Fluc	1847	3496	Reportergen Firefly Luziferase
T7-rev	4413	4429	Erkennungssequenz der T7-Polymerase auf dem Gegenstrang
Amp R	5608	6467	Kodierende Sequenz für beta-Laktamase (Ampicillin-Resistenz)
CMV	7092	7668	Entspricht 147-742 aus "hCMV major immediate-early gene, enhancer" (K03104, NCBI)



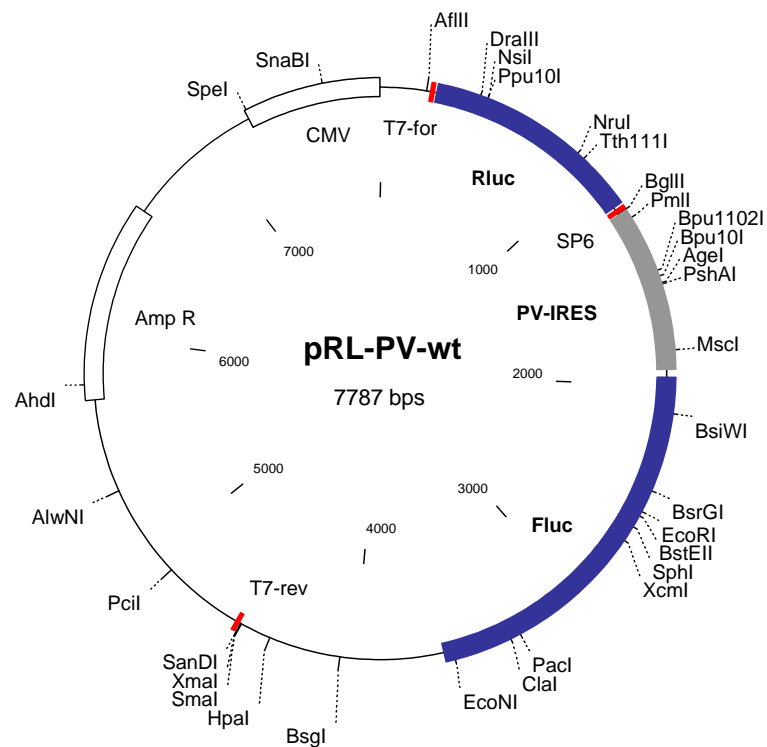
**pCAT-PV-wt (7403 bps)**

Name	Start	Ende	Beschreibung
SP6	6585	6601	Erkennungssequenz der SP6-Polymerase
CAT	6652	7312	Reportergen Chloramphenicol-Acetyltransferase
PV-IRES	5	713	Poliovirus-IRES (Wildtyp)
Fluc	747	2398	Reportergen Firefly Luziferase
T7-rev	3315	3331	Erkennungssequenz der T7-Polymerase auf dem Gegenstrang
Amp R	4510	5369	Kodierende Sequenz für beta-Laktamase (Ampicillin-Resistenz)
CMV	5981	6576	Entspricht 147-742 aus "hCMV major immediate-early gene, enhancer" (K03104, NCBI)



**pRL-PV-wt (7787 bps)**

Name	Start	Ende	Beschreibung
T7	219	235	Erkennungssequenz der T7-Polymerase
Rluc	247	1182	Reportergen Chloramphenicol-Acetyltransferase
SP6	1195	1211	Erkennungssequenz der SP6-Polymerase
PV-IRES	1221	1929	Poliovirus-IRES (Wildtyp)
Fluc	1963	3614	Reportergen Firefly Luziferase
T7-rev	4531	4547	Erkennungssequenz der T7-Polymerase auf dem Gegenstrang
Amp R	5726	6586	Kodierende Sequenz für beta-Laktamase (Ampicillin-Resistenz)
CMV	7197	7786	Entspricht 147-742 aus "hCMV major immediate-early gene, enhancer" (K03104, NCBI)



**Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden**

Name	Sequenz
Fluc-for-050711	GAC GAA CAC TTC TTC ATA GTT GAC CGC
Rluc_for	CAC TTC AGC CAG GAG GAC GC
Rluc_rev	TTG GTC TCC TTA AAC CTG TC
pD-T7-for	CTA GCC TTA AGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG AC
pD-T7-rev	TCG AGT CGC CCT ATA GTG AGT CGT ATT ACT TAA CG
CMV_for	TGT GAA ATA CCG CAC AGA TG
PV_rev	AAA TTG TAC TTA GAG TAA ACA CAC
FMDV_rev	CAT GTG TTC AGT GGT TAT AAA AG

**Tab. 1: Rluc-Expression von mono- und dicistronischen RNAs in Kaninchen-Retikulozytenlysats (RRL) bei 50, 100 und 120 mM K<sup>+</sup>-Konzentration**

Datum		pRL-FM-wt RNA (4152 nt), dicistronisch					phRL-null RNA (1218 nt), monocistronisch					
		ng	pmol	50 mM	100 mM	120 mM	ng	pmol	Faktor	50 mM	100 mM	120 mM
06.09.2006	ohne m <sup>7</sup> GDP	200	1,46	644.142	484.649	80.479	2.000	497,59	340	32.243.579	2.690.691	207.252
06.09.2006	mit m <sup>7</sup> GDP	200	1,46	5.938.540	196.520	10.022	2.000	497,59	340	48.055.395	867.353	78.860
18.10.2006	ohne m <sup>7</sup> GDP	5	0,04	24.960.586	25.201.278	2.290.501	20	4,98	124	7.978.730	14.987.003	1.234.058
18.10.2006	mit m <sup>7</sup> GDP	5	0,04	35.963.088	5.497.522	379.238	20	4,98	124	6.231.655	193.895	32.388
18.10.2006	mit GDP	5	0,04	34.832.860	23.370.130	529.438	20	4,98	124	7.165.817	9.621.428	46.501
25.10.2006	ohne m <sup>7</sup> GDP	20	0,15	19.354.088	29.689.266	5.574.579	10	2,49	16	12.895.602	18.585.538	3.530.657
25.10.2006	mit m <sup>7</sup> GDP	20	0,15	22.318.230	4.414.700	300.044	10	2,49	16	17.658.052	918.403	64.290
25.10.2006	mit GDP	20	0,15	24.291.052	31.919.590	17.143	10	2,49	16	14.064.112	18.441.410	160.422

ng: pro Konzentration eingesetzte RNA-Menge in ng, pmol: pro Konzentration eingesetzte RNA-Menge in pmol, Faktor: "Überschuss" mono- zu dicistronischer RNA

**Tab. 2: Rluc-Expression von mono- und dicistronischen RNAs in HeLa-Zellextrakt bei 50, 100 und 120 mM K<sup>+</sup>-Konzentration**

Datum		pRL-FM-wt RNA (4152 nt), dicistronisch					phRL-null RNA (1218 nt), monocistronisch					
		ng	pmol	50 mM	100 mM	120 mM	ng	pmol	Faktor	50 mM	100 mM	120 mM
26.10.2006	ohne m <sup>7</sup> GDP	20	0,15	6.763	3.969.402	48.819.524	10	2,49	16	6.745	3.116.655	19.687.488
26.10.2006	mit m <sup>7</sup> GDP	20	0,15	9.063	484.089	18.117.912	10	2,49	16	8.750	353.757	4.550.124
26.10.2006	mit GDP	20	0,15	7.416	1.099.410	1.690.353	10	2,49	16	7.405	1.066.596	6.028.606
06.11.2006	ohne m <sup>7</sup> GDP	20	0,15	1.693	1.825.024	27.544.828	2	0,50	3	4.507	536.931	6.910.564
06.11.2006	mit m <sup>7</sup> GDP	20	0,15	2.667	162.109	10.927.911	2	0,50	3	3.151	67.376	964.022
06.11.2006	mit GDP	20	0,15	2.334	440.150	11.720.663	2	0,50	3	3.249	180.017	966.687

ng: pro Konzentration eingesetzte RNA-Menge in ng, pmol: pro Konzentration eingesetzte RNA-Menge in pmol, Faktor: "Überschuss" mono- zu dicistronischer RNA

**Tab. 3: Rluc-Expression von mono- und dicistronischen RNAs in Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL) bei 50, 100 und 120 mM K<sup>+</sup>-Konzentration unter Berücksichtigung gleicher molarer Mengen**

Datum		pRL-FM-wt RNA (4152 nt), dicistronisch			phRL-null RNA (1218 nt), monocistronisch		
		50 mM	100 mM	120 mM	50 mM	100 mM	120 mM
06.09.2006	ohne m <sup>7</sup> GDP	644.142	484.649	80.479	94.834	7.914	610
06.09.2006	mit m <sup>7</sup> GDP	5.938.540	196.520	10.022	141.339	2.551	232
18.10.2006	ohne m <sup>7</sup> GDP	24.960.586	25.201.278	2.290.501	64.345	120.863	9.952
18.10.2006	mit m <sup>7</sup> GDP	35.963.088	5.497.522	379.238	50.255	1.564	261
18.10.2006	mit GDP	34.832.860	23.370.130	529.438	57.789	77.592	375
25.10.2006	ohne m <sup>7</sup> GDP	19.354.088	29.689.266	5.574.579	805.975	1.161.596	220.666
25.10.2006	mit m <sup>7</sup> GDP	22.318.230	4.414.700	300.044	1.103.628	57.400	4.018
25.10.2006	mit GDP	24.291.052	31.919.590	17.143	879.007	1.152.588	10.026

**Tab. 4: Rluc-Expression von mono- und dicistronischen RNAs in HeLa-Zellextrakt bei 50, 100 und 120 mM K<sup>+</sup>-Konzentration unter Berücksichtigung gleicher molarer Mengen**

Datum		pRL-FM-wt RNA (4152 nt), dicistronisch			phRL-null RNA (1218 nt), monocistronisch		
		50 mM	100 mM	120 mM	50 mM	100 mM	120 mM
26.10.2006	ohne m <sup>7</sup> GDP	6.763	3.969.402	48.819.524	422	194.791	1.230.468
26.10.2006	mit m <sup>7</sup> GDP	9.063	484.089	18.117.912	547	22.110	284.383
26.10.2006	mit GDP	7.416	1.099.410	1.690.353	463	66.662	376.788
06.11.2006	ohne m <sup>7</sup> GDP	1.693	1.825.024	27.544.828	1.502	178.977	2.303.521
06.11.2006	mit m <sup>7</sup> GDP	2.667	162.109	10.927.911	1.050	22.459	321.341
06.11.2006	mit GDP	2.334	440.150	11.720.663	1.083	60.006	322.229

**Tab. 5: Rluc-Expression [%] von mono- und dicistronischen RNAs in Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL) bei 50, 100 und 120 mM K<sup>+</sup>-Konzentration unter Berücksichtigung gleicher molarer Mengen**

Datum		pRL-FM-wt RNA (4152 nt), dicistronisch			phRL-null RNA (1218 nt), monocistronisch		
		50 mM	100 mM	120 mM	50 mM	100 mM	120 mM
06.09.2006	ohne m <sup>7</sup> GDP	100,0	75,2	12,5	14,7	1,2	0,1
06.09.2006	mit m <sup>7</sup> GDP	100,0	3,3	0,2	2,4	0,0	0,0
18.10.2006	ohne m <sup>7</sup> GDP	100,0	101,0	9,2	0,3	0,5	0,0
18.10.2006	mit m <sup>7</sup> GDP	100,0	15,3	1,1	0,1	0,0	0,0
18.10.2006	mit GDP	100,0	67,1	1,5	0,2	0,2	0,0
25.10.2006	ohne m <sup>7</sup> GDP	100,0	153,4	28,8	4,2	6,0	1,1
25.10.2006	mit m <sup>7</sup> GDP	100,0	19,8	1,3	4,9	0,3	0,0
25.10.2006	mit GDP	100,0	131,4	0,1	3,6	4,7	0,0

Dicistronischer pRL-FM-wt bei 50 mM = 100%

**Tab. 6: Rluc-Expression [%] von mono- und dicistronischen RNAs in HeLa-Zellextrakt bei 50, 100 und 120 mM K<sup>+</sup>-Konzentration unter Berücksichtigung gleicher molarer Mengen**

Datum		pRL-FM-wt RNA (4152 nt), dicistronisch			phRL-null RNA (1218 nt), monocistronisch		
		50 mM	100 mM	120 mM	50 mM	100 mM	120 mM
26.10.2006	ohne m <sup>7</sup> GDP	0,0	8,1	100,0	0,0	0,4	2,5
26.10.2006	mit m <sup>7</sup> GDP	0,1	2,7	100,0	0,0	0,1	1,6
26.10.2006	mit GDP	0,4	65,0	100,0	0,0	3,9	22,3
06.11.2006	ohne m <sup>7</sup> GDP	0,0	6,6	100,0	0,0	0,6	8,4
06.11.2006	mit m <sup>7</sup> GDP	0,0	1,5	100,0	0,0	0,2	2,9
06.11.2006	mit GDP	0,0	3,8	100,0	0,0	0,5	2,7

Dicistronischer pRL-FM-wt bei 120 mM = 100%

**Tab. 7: Rluc-Expression [%] von mono- und dicistronischen RNAs in Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL) bei 50, 100 und 120 mM K<sup>+</sup>-Konzentration unter Berücksichtigung gleicher molarer Mengen**

	pRL-FM-wt RNA (4152 nt), dicistronisch			phRL-null RNA (1218 nt), monocistronisch		
	50 mM	100 mM	120 mM	50 mM	100 mM	120 mM
<b>ohne m<sup>7</sup>GDP</b>	100,0	75,2	12,5	14,7	1,2	0,1
	100,0	101,0	9,2	0,3	0,5	0,0
	100,0	153,4	28,8	4,2	6,0	1,1
	<b>100,0</b>	<b>109,9</b>	<b>16,8</b>	<b>6,4</b>	<b>2,6</b>	<b>0,4</b>
<b>mit m<sup>7</sup>GDP</b>	100,0	3,3	0,2	2,4	0,0	0,0
	100,0	15,3	1,1	0,1	0,0	0,0
	100,0	19,8	1,3	4,9	0,3	0,0
	<b>100,0</b>	<b>12,8</b>	<b>0,9</b>	<b>2,5</b>	<b>0,1</b>	<b>0,0</b>
<b>mit GDP</b>	100,0	67,1	1,5	0,2	0,2	0,0
	100,0	131,4	0,1	3,6	4,7	0,0
	<b>100,0</b>	<b>99,3</b>	<b>0,8</b>	<b>1,9</b>	<b>2,5</b>	<b>0,0</b>

Dicistronischer pRL-FM-wt bei 50 mM = 100%



**Tab. 8: Rluc-Expression [%] von mono- und dicistronischen RNAs in HeLa-Zellextrakt bei 50, 100 und 120 mM K<sup>+</sup>-Konzentration unter Berücksichtigung gleicher molarer Mengen**

	pRL-FM-wt RNA (4152 nt), dicistronisch			phRL-null RNA (1218 nt), monocistronisch		
	50 mM	100 mM	120 mM	50 mM	100 mM	120 mM
ohne m <sup>7</sup> GDP	0,0	8,1	100,0	0,0	0,4	2,5
	0,0	6,6	100,0	0,0	0,6	8,4
	<b>0,0</b>	<b>7,4</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,5</b>	<b>5,5</b>
mit m <sup>7</sup> GDP	0,1	2,7	100,0	0,0	0,1	1,6
	0,0	1,5	100,0	0,0	0,2	2,9
	<b>0,1</b>	<b>2,1</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,2</b>	<b>2,3</b>
mit GDP	0,4	65,0	100,0	0,0	3,9	22,3
	0,0	3,8	100,0	0,0	0,5	2,7
	<b>0,2</b>	<b>34,4</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>	<b>2,2</b>	<b>12,5</b>

Dicistronischer pRL-FM-wt bei 120 mM = 100%

---

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromol/L
A	Adenin
AA	Acrylamid
Amp R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUG	Start-Codon
bp	Basenpaar
bps	Basenpaare
C	Cytosin
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
Cap	7-Methylguanosin-Kappe (m <sup>7</sup> GpppN) am 5'-Ende einer mRNA
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
cDNA	complementary DNA (von RNA revers transkribierte DNA)
Ci	Curie
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CMV	hCMV IE enhancer region
CMV	Cytomegalievirus
CTP	Cytosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	Eukaryotic initiation factor (eukaryotischer Initiationsfaktor)
EMCV	Encephalomyokarditis-Virus
eRF	Eukaryotic release factor (eukaryotischer Terminationsfaktor)
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethylalkohol
FBS	fetale bovine serum (Fötales Kälberserum)
Fluc	Firefly Luziferase (aus <i>Photinus pyralis</i> )
FMDV	Foot-and-mouth disease virus (Maul- und Klauenseuche Virus)
g	Maßeinheit der Erdbeschleunigung (9,81 m/sec)
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
hCMV	human Cytomegalovirus
HCV	Hepatitis C Virus
IRES	Internal Ribosome Entry Site (interne Ribosomen-Eintrittsstelle)
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasenpaare

---

KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Mol/L
mAmp	Milliampere
mol	Mol
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mut	Mutante
n	nano
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
nt	Nukleotid(e)
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame (offenes Leseraster)
p	pico
PABP	Poly(A)-binding protein (Poly(A)-bindendes Protein)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	Potentia hydrogenii (der negative dekadische Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration)
PLB	Passive Lysis Buffer (Lysis-Puffer für eukaryotische Zellen)
pmol	picomol
PV	Poliovirus
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase (RNA-abhängige RNA-Polymerase)
RLB	Reporter Lysis Buffer (Lysis-Puffer für eukaryotische Zellen)
Rluc	<i>Renilla</i> Luziferase (aus <i>Renilla reniformis</i> )
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
RRL	Rabbit reticulocyte lysate (Kaninchen-Retikulozytenlysat)
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase (Alkalische Phosphatase aus <i>Pandalus borealis</i> )
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunden
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
tRNA	transfer-RNA
U	Unit (Einheit)
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
UTR	Untranslated region (nicht-translatierte Region)
UV	Ultraviolett
v/v	volume/volume (Volumen/Volumen)
w/v	weight/volume (Gewicht/Volumen)
w/w	weight/weight (Gewicht/Gewicht)
wt	Wildtyp

**Verzeichnis der Abbildungen**

- Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Genomorganisation von Picornaviren
- Abb. 1.2 Schematische Darstellung des Infektionszyklus eines Picornavirus
- Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Initiationskomplexes eIF4F und seiner Interaktion mit PABP
- Abb. 1.4 Modell der cap-abhängigen Initiation der Translation bei Eukaryoten
- Abb. 1.5 Organisation viraler IRES-Elemente
- Abb. 1.6 Schematische Darstellung des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF4G
- Abb. 1.7 Schematische Darstellung eines dicistronischen Reporterkonstrukts
- Abb. 2.1 Einfluss der Salzkonzentration auf die Translation des ersten Reporters in einer dicistronischen RNA mit einer FMDV-IRES
- Abb. 2.2 Translation des ersten Reportergens CAT bei verschiedenen Salzkonzentrationen
- Abb. 2.3 Translation des ersten Reportergens Rluc bei verschiedenen Salzkonzentrationen
- Abb. 2.4 Translation der Reportergene bei Salzkonzentrationen von 50 bis 160 mM K<sup>+</sup> in HeLa-Zellextrakt
- Abb. 2.5 Die Verstärkung der Expression des ersten Reporters ist ein Effekt, der nicht in *trans* auftritt
- Abb. 2.6 Einfluss von Wildtyp- und mutierter FMDV-IRES auf die Translation des ersten Reporters
- Abb. 2.7 Einfluss von Wildtyp- und mutierter Poliovirus-IRES auf die Translation des ersten Reporters
- Abb. 2.8 Wirkung eines picornavirales IRES-Element auf die Verstärkung der Translation des ersten Reporters
- Abb. 2.9 Transfektion unprozessierter dicistronischer RNA in eukaryotische Zellen
- Abb. 2.10 Transfektion dicistronischer gecappter und polyadenylierter RNA in eukaryotische Zellen
- Abb. 2.11 Expression des ersten Reporters CAT
- Abb. 2.12 Expression eines Konstrukts ohne IRES (RlucFluc) im Vergleich zur Expression der beiden Reportergene einer dicistronischen RNA (RL-FM) *in vivo*
- Abb. 2.13 Für die Stimulation der Translation des ersten Reporters sind drei Erklärungen möglich
- Abb. 2.14 Einfluss der Translation des zweiten Reporters auf die Stimulation der Translation des ersten Reporters durch IRES-Elemente bei 120 mM K<sup>+</sup> (FMDV) bzw. 80 mM K<sup>+</sup> (Poliovirus)

- Abb. 2.15 Einfluss der Translation des zweiten Reporters auf die Stimulation der Translation des ersten Reporters durch ein Wildtyp-IRES-Element bei Konzentrationen von 50 bis 160 mM K<sup>+</sup>
- Abb. 2.16 Eine HCV-IRES in einem dicistronischen Kontext stimuliert nicht die Expression des stromaufwärts gelegenen Reporters
- Abb. 2.17 Die Stimulation der Translation des ersten Reporters ist von der Bindung und Weitergabe des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF4F bedingt
- Abb. 2.18 Hippuristanol inhibiert die Translation einer dicistronischen RNA
- Abb. 2.19 Eine HCV-IRES vor einem dicistronischen Konstrukt hebt die Wirkung von Hippuristanol auf
- Abb. 2.20 eIF4F ist für die Stimulation der Translation des ersten Reporters verantwortlich
- Abb. 2.21 Das C-terminale Ende von eIF4G ist für die Stimulation der Expression des ersten Reporters ausreichend
- Abb. 3.1 Schematische Darstellung des Translationsfaktors eIF4G
- Abb. 3.2 Ein picornavirales IRES-Element kann den Initiationskomplex eIF4F an das 5'-Ende der RNA weitergeben
- Abb. 3.3 Schematische Darstellung einer dicistronischen RNA mit FMDV-IRES
- Abb. 3.4 Dicistronisches HCV-Replikon
- Abb. 3.5 Dicistronisches HCV-Replikon mit Fluc-Reportergen vor einer picornaviralen IRES
- Abb. 3.6 Dicistronisches HCV-Replikon Ntat2ANeo

**Verzeichnis der Tabellen**

Tab. 1.1	Die Einteilung der Picornaviren
Tab. 1.2	Funktionen der Proteine von Picornaviren am Beispiel von Poliovirus und FMDV
Tab. 1.3	Eukaryotische Initiationsfaktoren und zelluläre Faktoren
Tab. 3.1	Publikationen über eine mögliche Rolle der 3'-UTR von HCV bei der Translation
Tab. 4.1	Verwendete Flüssigmedien
Tab. 4.2	Konzentrationen der verwendeten Antibiotika
Tab. 4.3	Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten mono- und dicistronischen Konstrukte
Tab. 4.4	Im Präparationskit "GFX <i>Micro</i> Plasmid Prep Kit" enthaltene Lösungen
Tab. 4.5	Im Präparationskit "Nucleobond AX 100" enthaltene Lösungen
Tab. 4.6	Beispiel für einen Ligationsansatz
Tab. 4.7	Beispiel für einen Transkriptionsansatz
Tab. 4.8	Oligonukleotide für die Generierung "kurzer" Templates
Tab. 4.9	Beispiel für einen PCR-Ansatz
Tab. 4.10	Beispiel für einen Translationsansatz in RRL
Tab. 4.11	Verwendete Antikörper für den Nachweis der Spaltung von eIF4G
Tab. 4.12	Substrat und Puffer für die Messung von Firefly Luziferase
Tab. 4.13	Substrat und Puffer für die Messung von <i>Renilla</i> Luziferase
Tab. 4.14	Beispiel für einen Reaktionsansatz des CAT-Assays
Tab. 4.15	Puffer für die Extraktion cytoplasmatischer RNA ("RNeasy Mini Kit" von Qiagen)

**Publikationen:**

Jünemann, C., Song, Y., Bassili, G., Goergen, D., Henke, J. & Niepmann, M. (2007). Picornavirus internal ribosome entry site elements can stimulate translation of upstream genes. *J. Biol. Chem.* 282, 132-141.

Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Jünemann, C., Bartenschlager, R. & Niepmann, M. (2006). The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J. Virol.* 80, 11579-11588.

**Kongressbeiträge:**

Jünemann, C., Bassili, G., Song, Y., Niepmann, M. Translation enhancement: Picornavirus IRES elements stimulate translation of upstream genes in dicistronic vectors.

*XIIIth International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses, 27. bis 31. August 2006, Cairns, Australien.*

Jünemann, C., Bassili, G., Niepmann, M. Translation enhancement: Picornavirus IRES elements stimulate translation of upstream genes in dicistronic vectors in *cis*.

*Jährliche Konferenz der Gesellschaft für Virologie, 15. bis 18. März 2006, München, Deutschland.*

Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Jünemann, C., Niepmann, M. The Hepatitis C Virus RNA 3'-Untranslated region strongly enhances Translation directed by the Internal Ribosome Entry Site.

*Jährliche Konferenz der Gesellschaft für Virologie, 15. bis 18. März 2006, München, Deutschland.*

Tzima, E., Song, Y., Jünemann, C., Bindereif, A., Jacquemin-Sablon, Niepmann, M. Cellular proteins enhance translation directed by the internal ribosome entry site of Hepatitis C virus in the presence of the viral 3'-untranslated region.

*Jährliche Konferenz der Gesellschaft für Virologie, 15. bis 18. März 2006, München, Deutschland.*

Jünemann, C., Bassili, G., Song, Y., Tzima, E., Niepmann, M. Translation enhancement: Picornavirus IRES elements stimulate translation of upstream genes in dicistronic vectors.

*XIIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, 23. bis 29. Mai 2005, Lunteren, Niederlande.*

Jünemann, C., Bassili, G., Song, Y., Tzima, E., Niepmann, M. Translation enhancement: Picornavirus IRES elements stimulate translation of upstream genes in dicistronic vectors.

*Jährliche Konferenz der Gesellschaft für Virologie, 16. bis 19. März 2005, Hannover, Deutschland.*

Song, Y., Tzima, E., Jünemann, C., Niepmann, M. The Hepatitis C Virus RNA 3'-Untranslated region strongly enhances Translation directed by the Internal Ribosome Entry Site.

*Jährliche Konferenz der Gesellschaft für Virologie, 16. bis 19. März 2005, Hannover, Deutschland.*

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2003 bis Juni 2007 in der Arbeitsgruppe von HDoz Dr. Michael Niepmann im Biochemischen Institut des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt.

Die Promotion wurde durch den Sonderforschungsbereich 535 "Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern" im Rahmen des Teilprojektes B1 "Regulation der Translation bei Picornaviren und Hepatitis C Virus" gefördert.

Eine solche Arbeit entsteht nie ohne die Unterstützung, Diskussionsbereitschaft, den Teamgeist und das Verständnis vieler Menschen. Daher danke ich allen Menschen, die mich auf meinem Weg hierhin begleitet haben, insbesondere

Frau Prof. Tina Trenczek, meiner Doktormutter, für die Betreuung dieser Arbeit und die Zeit, die sie sich genommen hat...

Michael, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit und das Vertrauen, Erklären, Diskutieren und seine Geduld...

Ewald, für die Bereitschaft, seinen großen Erfahrungsschatz mit mir zu teilen, und für das Reparieren von mir lieb gewonnenen Laborgeräten...

Barbara und Ralf, die für einen reibungslosen Laboralltag gesorgt haben...

Meinen Kolleginnen und Kollegen aus den Arbeitsgruppen Niepmann und Beck: Carmen, Dagmar, Elena, Gergis, Juliane, Jura, Michael, Pilar und Yutong, mit denen ich diskutieren und diskutieren konnte und die meine Fragen und meinen Humor ertragen haben...

P. Mavromara für das Plasmid pHPI933, B. Kastner und A. Miller für den cytoplasmatischen HeLa-Extrakt und J. Tanaka und J. Pelletier für Hippuristanol.

Meiner Frau Andrea für ihre Ausgeglichenheit und ihre Liebe.



### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, im Juni 2007

Christiane Jünemann